

Einfluss eines veränderten Methylierungspotenzial auf die MGMT-Promotormethylierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Anant Hermann Geisler
aus
Mainz

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Kloor
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Simoes

*In Liebe und Dankbarkeit
meiner Frau Julia
und meinen bezaubernden Kindern*

In Erinnerung meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Bisheriger Kenntnisstand	2
1.3 DNA-Methyltransferasen und S-Adenosylmethionin	5
1.4 Die S-Adenosylhomocystein-Hydrolase und das Methylierungspotenzial	5
1.5. Abhängigkeit der Therapie vom Methylierungsstatus des MGMT-Promotors ..	7
1.6 Ziel der aktuellen Untersuchungen	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Zelllinien	12
2.2 Zellkultur.....	12
2.2.1 Kultivierung der Zelllinien	12
2.2.2 Subkultivierung der Zelllinien	12
2.2.3 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen	13
2.3 Inkubation der Zellen mit pharmakologischen Substanzen	13
2.3.1 Inkubation der Zellreihe LN-229 mit S-Adenosylmethionin	14
2.3.2 Analyse des Abbaus von S-Adenosylmethionin im Nährmedium.....	14
2.3.3 Inkubation der Zellreihe TU 113 mit Methionin und Glukose.....	15
2.3.3 Hemmung des Methylierungspotenzials durch Adenosin-2'3'-Dialdehyd ..	15
2.4 HPLC.....	16
2.4.1 Theoretische Grundlagen zur HPLC	16
2.4.2 Beschreibung des Messsystems.....	17
2.4.3 Die Weitere Aufbereitung der Zellen für die Messung mit der HPLC	19
2.4.4 Trypsinieren der Zellen	19
2.4.5 Direktes Lysieren der Zellen mit Perchlorsäure 0,6M.....	20
2.4.6 Festphasenextraktion	20
2.4.7 Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung der Adeninnukleotide.....	21

2.4.8 Bestimmung der S-Adenosylmethionin Konzentration der Nährmedien vor und nach Inkubation.....	21
2.4.9 Eichung des Messsystems und interne Standardisierung.....	21
2.4.10 Massenspektroskopische Bestimmung von Methylthioadenosin.....	23
2.4.11 Messung der Adeninnukleotide mittels HPLC	23
2.4.12 Berechnung des EC nach Atkinson und Walton.....	23
2.5. Agarosegelelektrophorese.....	24
2.5.1 DNA-Isolation	24
2.5.2 DNA Konzentrationsbestimmung	25
2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung.....	25
2.6 Nachweis der globalen DNA-Methylierung mittels Cytosin-Extension-Assay ..	26
2.6.1 Prinzip des Cytosin-Extension-Assays	26
2.6.2 Isolation genomischer DNA.....	26
2.6.3. Gelelektrophoretische Auftragung von DNA	26
2.6.4 Cytosin-Extension-Assay	28
2.7. Bestimmung der MGMT-Promotormethylierung	28
2.7.1 Bisulfit-Sequenzierung	29
2.8. Statistik.....	29
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Aufarbeitung der Zellen für die Bestimmung des Methylierungspotenzial	30
3.2. Beeinflussung des Methylierungspotenzials.....	31
3.2.1 Inkubation der Zellen LN-229 mit S-Adenosylmethionin	31
3.2.2 Inkubation der Zelllinie TU 113 mit Methionin und/oder Glukose	32
3.2.3 Inkubation der Zelllinien TU 113 und LN-229 mit Adenosin-2',3'-dialdehyd	34
3.3. Bestimmung der Adeninnukleotide.....	35
3.4 Bestimmung der SAM-Konzentration im SAM-versetzten Medium	37

3.5 Methylthioadenosin	38
3.6 Bestimmung der globalen DNA-Methylierung.....	40
3.7 MGMT-Promotormethylierung	41
4. Diskussion	43
Zusammenfassung.....	56
Literaturverzeichnis	57

Verzeichnis der Abkürzungen

Ado	Adenosin
Ado-2'3'-Dial	Adenosin-2'3'-Dialdehyd
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BHMT	Betain-Homocystein-S-Methyltransferase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-(Phosphat)-Guanin Dinukleotid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dpm	Desintegrationen pro minute
EC	Energieladung (Energy charge)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EORTC	European Organisation For Research And Treatment Of Cancer
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal calf serum)
g*	Erdbeschleunigung (*in Zusammenhang mit Zentrifugengeschwindigkeiten)
Glc	Glukose
H ₂ O	Wasser
Hcy	Homocystein
HPLC	High Performance Liquid Chromatografy
IDH1	Isozitrat Dehydrogenase 1 Gen
LMA	Laufmittel A (s. Tab. 2.4)
LMB	Laufmittel B (s. Tab. 2.4)

Lsg	Lösung
M	mol/l
MAT	L-Methionin-S-Adenosyltransferase
Met	Methionin
MEHT	5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein S-Methyltransferase
MP	Methylierungspotenzial
mRNA	messenger RNA
NCIC	National Cancer Institute of Canada
nm	Nanometer
5'Nu	5'-Nukleotidase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PCS	Perchlorsäure
Pen	Penicillin
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAHH	S-Adenosylhomocystein Hydrolase
SAM	S-Adenosylmethionin
SEM	Mittlerer Standardfehler (Standard error of the mean)
Strep	Streptomycin
T	Thymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA (Tab. 2.7)
Taq	Thermus Aquaticus (im Zusammenhang mit der thermostabilen Taq-Polymerase)
TH-Folat	Tetrahydrofolat
TMZ	Temozolomid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

In der Behandlung des Glioblastoms, des häufigsten primären Hirntumors des Menschen hat sich in der Zytostatikatherapie die alkylierende Substanz Temozolomid (TMZ) bewährt. Der Methylierungsstatus des O⁶-Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)-Genpromotors zeigte sich unter Therapie mit dieser Substanz stark prädiktativ für ein verlängertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben von Glioblastompatienten (Hegi et al. 2005). Deshalb wurden eine Reihe von Strategien verfolgt um die MGMT-vermittelte Zytostatikaresistenz zu durchbrechen. Diese beinhalteten z. B. die Behandlung mit O⁶-Benzylguanin als nicht toxisches Pseudosubstrat der MGMT oder eine RNA-Interferenz vermittelte Unterdrückung des MGMT-Genes. Eine andere Strategie ist die MGMT-Aktivität zu verringern, indem man TMZ nicht in dem ursprünglich üblichen Schema mit einer Applikation von 150-200 mg pro Tag an den Tagen 1-5 eines achtundzwanzig Tage dauernden Therapiezyklus verabreicht, sondern die Dosis verdichtet (z. B. durch Applikation an sieben Tagen eines vierzehntägigen Schemas). Jedoch zeigten sich diese alternativen Schemata konventionellen Dosierungsregimen nicht eindeutig überlegen. Auch ist anzumerken, dass nicht jeder Patient, dessen MGMT-Promotor methyliert ist, auch auf Alkylantien anspricht. Außerdem bedeutet ein primäres Ansprechen nicht, dass die Patienten keine Rückfälle erleiden, die Gesamtprognose der Erkrankung bleibt schlecht (Hegi et al. 2008). Die Methylierung eukaryonter DNA allgemein steht in engem Zusammenhang mit Transkription, Karzinogenese, X-Chromosom-Inaktivierung und genetischer Prägung. Als Donor einer aktivierten Methylgruppe fungiert S-Adenosylmethionin (SAM). Nach der Übertragung der Methylgruppe auf einen Akzeptor, z. B. DNA, bleibt S-Adenosyl-Homocystein (SAH) zurück, welches ein potenter Hemmstoff der Methyltransferasen ist. Da SAH durch die Hydrolyse der SAH-Hydrolase abgebaut wird, reguliert die Aktivität der SAH-Hydrolase die intrazellulären Konzentrationen von SAH und beeinflusst so indirekt Transmethylierungsprozesse. Deshalb könnte auch die Beeinflussung der SAH-Hydrolase Aktivität für den Methylierungsstatus des MGMT-Genpromotors von Bedeutung sein.

1.1 Bisheriger Kenntnisstand

Die Expression der Gene wird üblicherweise durch das Zusammenspiel von mehreren Transkriptionsfaktoren gesteuert. Seit Jahren ist jedoch bekannt, dass noch weitere Regulationsmechanismen existieren, die in die Genexpression eingreifen. Diese Mechanismen, die nicht dem klassischen Modell der Transkriptionskontrolle folgen, werden unter dem Oberbegriff Epigenetik zusammengefasst. Die Gruppe der epigenetischen Mechanismen ist sehr heterogen und beinhaltet Effekte wie RNA-Interferenz (Fire et al. 1998), Histonmodifizierungen, wie die Deacetylierung (Ferreira et al. 2007) oder DNA-Methylierung (Attwood et al. 2002; Aranda et al. 2009). Prinzipiell wird durch die Deacetylierung und die Methylierung von Histonen und DNA die DNA, bzw. das Nukleosom, in Struktur oder Konformation so verändert, dass sie dem Zugriff der Transkriptionsfaktoren entzogen ist. Fehlerhafte Acetylierungen oder Methylierungen sind Schlüsselmechanismen bei der Entstehung von Tumoren (Ushijima 2005; Esteller 2006; Schinke et al. 2010). Unter DNA-Methylierung versteht man die epigenetische Modifikation der DNA-Base Cytosin durch kovalente Bindung einer Methylgruppe an der 5'-Position des Pyrimidinringes im Bereich von Cytosin-Guanin Dinukleotiden, CpGs (Abb.1.1) (Bird 1992). Bei Vertebraten erfolgt die Cytosin-Methylierung vorwiegend bimodal, während 70 % aller CpG-Dinukleotide methyliert sind bleiben sogenannte CpG-Inseln unmethyliert (Singal and Ginder 1999). CpG-Inseln definieren sich durch eine Länge größer als 500 bp und einem CpG-Anteil größer 55 %, sowie einem Verhältnis erwarteten CpG-Anteils zu tatsächlichem von 0,65 (Takai and Jones 2002). Die Frequenz von CpG im Säugergenom erweist sich als niedriger, als statistisch zu erwarten wäre, der CpG-Anteil hat sich also evolutionär verringert. Verantwortlich ist ein Korrekturmechanismus, der durch Methylcytosin unterlaufen wird. Durch Desaminierung von Cytosin kann akzidentiell Uracil entstehen, welches genuin nicht in DNA, sondern hauptsächlich in RNA vorkommt, die Sequenzänderung wird als Fehler erkannt und das Uracil durch die Uracil-DNA-Glykosylase entfernt (Abb.1.1). Bei der Desaminierung von 5'-Methylcytosin entsteht aber Thymin, welches ein normaler Basenbaustein der DNA ist und somit nicht so effizient von zellulären Reparatursystemen erkannt wird. Dies kann zu einer

C→T Transition führen (Urnov 2002). So handelt es sich bei dem durch DNA-Methylierung im Bereich von CpG-Dinukleotiden entstehendem 5'-Methylcytosin um Hotspots für somatische Mutationen. Methylierung ist essentiell für die embryonale Entwicklung von Säugetieren, wie die frühe Letalität von Mäusen mit mangelnder DNA-Methyltransferasenaktivität zeigt. Sie dient normalerweise der gewebespezifischen Expressionsanpassung von Genen. Anhand von Beobachtungen an inaktivierten X-Chromosomen weiblicher Zellen und der Etablierung und Aufrechterhaltung allelspezifischer Expression ansonsten unterdrückter Gene, wurde die DNA-Methylierung vor allem als ein Mechanismus lebenslanger irreversibler Transkriptionsunterdrückung verstanden (Siegfried et al. 1999). Mittlerweile finden sich Untersuchungen, die die Verbindung von Methylierung allein mit der Transkriptionssuppression widerlegen. So zeigte sich, dass z. T. auch gerade aktive Gene einer gezielten Methylierung unterliegen können (Suzuki and Bird 2008). Wichtig ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass sich das geschilderte Methylierungsmuster von Vertebraten nicht auf Nicht-Vertebraten unter den Eukaryonten übertragen lässt. So weisen z. B. *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* als häufig studierte Modellsysteme keine DNMT(DNA-Methyltransferasen)-ähnlichen Gene auf und zeigen entsprechend auch keine DNA-Methylierung, was dazu führte, dass die grundsätzliche Bedeutung der DNA-Methylierung anfangs in Frage gestellt wurde (Bird 1992). Das häufigste Muster der Nicht-Vertebraten Methylierung ist die mosaikartige Methylierung. Sie zeichnet sich durch stark methylierte DNA-Domänen aus, die durchsetzt sind mit nicht methylierten DNA-Abschnitten. Den größten Anteil methylierter DNA unter allen Eukaryonten zeigten bisher mit nahezu 50 % Anteil methylierten Cytosins einige Pflanzen. Beim Mais zum Beispiel ist dieser hohe Anteil auf die große Zahl Transposons zurückzuführen, auf die die Methylierung abzielt. Dieses transkriptionelle Silencing von parasitären mobilen genetischen Elementen könnte eine evolutionäre Erklärung für den Ursprung der Methylierung sein. Die Cytosin-Methylierung bewirkt die Inaktivierung der Promotoren solcher Transposons und Viren, einschließlich Retroviren und Alu-Elementen. In der Tat ist der größte Teil des 5'-Methylcytosins im Genom innerhalb solcher

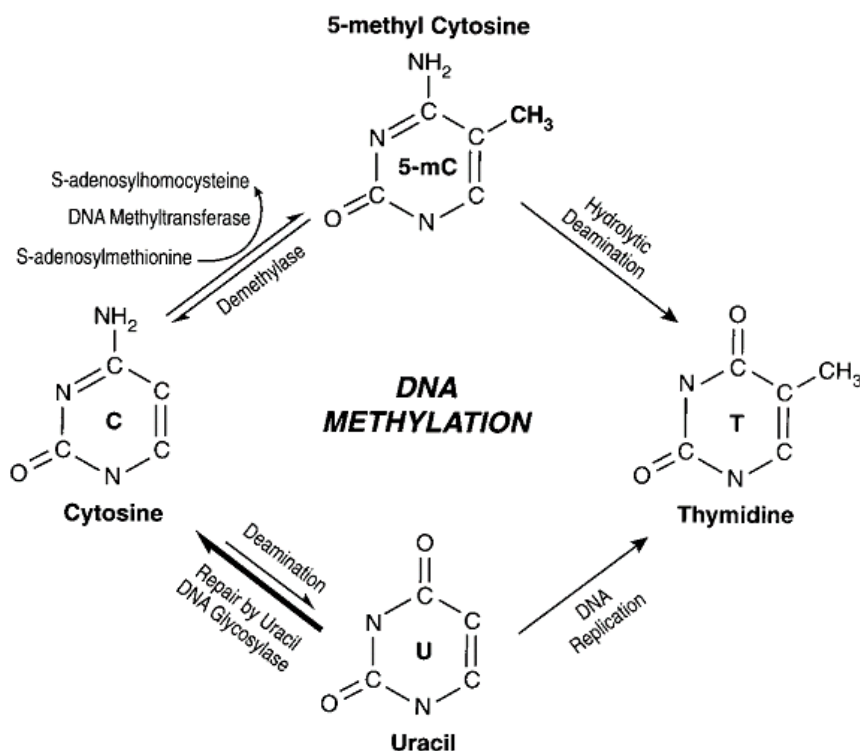


Abb. 1.1: Methylierung von Cytosin und Desaminierung des Methylcytosin führen schließlich zur Bildung von Thymin. (Singal and Ginder 1999)

Elemente lokalisiert (Yoder et al. 1997). Umgekehrt beschreiben Miller und Sweatt (Miller and Sweatt 2007) die Steigerung der DNMT-Genexpression im Hippocampus der Ratte als Antwort auf Angstkonditionierung von Mäusen und dass die Hemmung der DNMTs die Erinnerungsbildung blockiert. Angstkonditionierung ist assoziiert mit schneller Methylierung und transkriptioneller Unterdrückung des Erinnerungs-Unterdrückungsgens (Memory Suppressor Gene) PP, sowie Demethylierung und transkriptioneller Aktivierung des synaptischen Plastizitätsgenes Reelin, welches die Aktivität beider Systeme, der Methyltransferasen und Demethylasen während der Konsolidierung von Erlerntem zeigt. Dieses Beispiel zeichnet ein dynamischeres Bild der Regulation durch DNA-Methylierung im Gegensatz zu dem zuvor genannten, eher statischen Aspekt. Allerdings betrifft die DNA-Methylierung nicht nur die Aktivität der Gene, sondern auch die Organisation und Stabilität des Genoms. Zellen, deren DNA eine

deutliche Hypomethylierung aufweisen, zeigen eine erhöhte genomische Instabilität (Chen and Sun 1998; Rizwana and Hahn 1999). Dies wirkt sich auch auf das Teilungsverhalten der Zellen aus. Daher wurde auch eine Hypomethylierung der DNA bereits mehrfach im Zusammenhang mit dem Auftreten von Tumorerkrankungen beschrieben (Saito et al. 2002; Eden et al. 2003; Gaudet et al. 2003; Leistenschneider 2004).

1.3 DNA-Methyltransferasen und S-Adenosylmethionin

Die Methylierung von Nukleinsäuren, Proteinen und Phospholipiden wird durch Methyltransferasen vermittelt, die als aktivierten Methylgruppendonor S-Adenosyl-Methionin (SAM) verwenden (Cantoni 1952). Aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifität unterscheidet man bei der DNA-Methylierung zwischen Erhaltungs- (*maintenance*) und *de novo* DNA-Methyltransferasen (DNMT). Die Erhaltungs-Methyltransferase DNMT 1 methyliert hemi-methylierte DNA und überträgt bei der Replikation das Methylierungsmuster des Parentalstrangs auf den Tochterstrang. Die *de novo* Methyltransferasen DNMT 3a und 3b methylieren hemimethylierte und unmethylierte DNA mit gleicher Effizienz (Robertson and Jones 2000).

Die Synthese von SAM wird durch die in allen Zellen vorkommende L-Methionin-S-Adenosyltransferase (MAT) katalysiert. SAM entsteht durch den Transfer einer Adenosylgruppe von ATP auf das Schwefelatom des Methionins. Die intrazelluläre SAM-Konzentration wird durch die Aktivität der MAT, sowie die Aktivität der SAM-metabolisierenden Enzyme, SAM-Decarboxylase und die verschiedenen Methyltransferasen bestimmt.

1.4 Die S-Adenosylhomocystein-Hydrolase und das Methylierungspotenzial

Als Produkt aller SAM-abhängiger Transmethylierungsreaktionen entsteht S-Adenosylhomocystein (Cantoni and Scarano 1954). Da SAH an das aktive Zentrum der Methyltransferasen mit höherer Affinität als SAM bindet (Hoffman et al. 1979), ist SAH ein potenter Inhibitor der meisten, wenn nicht sogar aller, SAM-abhängigen Methylierungsreaktionen (Cantoni et al. 1979; Gibson et al. 1961). Daher ist ein effektiver Abbau des entstehenden SAHs Voraussetzung

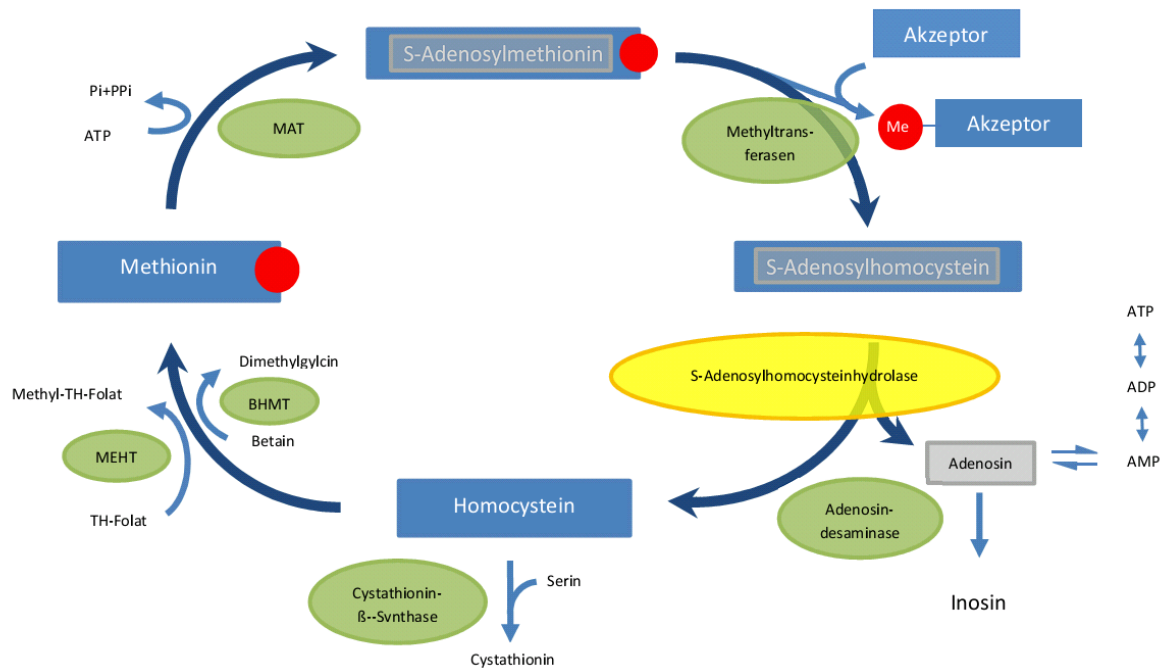


Abb. 1.2 Überblick über den intrazellulären SAM- und SAH-Metabolismus (Kloor et al. 2003; Hermes 2004a)

TH-Folat: Tetrahydrofolat; MEHT: 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein S-Methyltransferase; MAT: L-Methionin S-Adenosyl-Transferase; BHMT: Betain-Homocystein-S-Methyltransferase; 5'-Nu: 5'-Nukleotidase

für effiziente Methylierungsreaktionen (Hoffmann 1979). Der einzige bekannte Stoffwechselweg, über den SAH in Vertebraten metabolisiert wird, ist die Spaltung in Adenosin (Ado) und Homocystein (Hcy) durch die SAH-Hydrolase (Abb. 1.2) (Eloranta and Kajander 1984; Eloranta et al. 1982; De La Haba and Cantoni 1959). Die Analyse der Kristallstruktur der SAH-Hydrolase konnte zeigen, dass die katalytische Domäne der SAH-Hydrolase mit der katalytischen Domäne bakterieller Methyltransferasen nahezu identisch ist (Hu et al. 1999). Dies spricht für eine Kollokalisierung der SAH-Hydrolase und Methyltransferasen, die einen effizienten Austausch von SAH zwischen den katalytischen Zentren der Enzyme ermöglicht. So könnte die Effizienz von Transmethylierungsreaktionen gesteigert werden. Die Applikation des Methylgruppendonors SAM stimuliert die DNMT und hemmt die aktive Demethylierung der DNA, was zu einer

Steigerung der DNA Methylierung führt (Detich et al. 2002; Pascale et al. 2002). Hingegen führt eine Erhöhung der intrazellulären SAH-Konzentration zu einer Hemmung der DNMTs und einer DNA-Hypomethylierung (Caudill et al. 2001; Yi et al. 2000). Somit ist ein effektiver Abbau des entstehenden SAH durch die SAH-Hydrolase, die die reversible Hydrolyse von SAH zu Adenosin und Homocystein katalysiert, Voraussetzung für effiziente Methylierungsreaktionen innerhalb einer Zelle (Hoffman et al. 1979; Cantoni and Chiang 1980; Clarke and Banfield 2001). Obwohl die SAH-Hydrolase ursprünglich als ein zytoplasmatisches Enzym beschrieben wurde (De La Haba and Cantoni 1959), führt eine erhöhte mRNA-Synthese in transkriptionell aktiven Zellkernen, z. B. während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* oder der Erythropoetinbildung in der Niere zu einer vermehrten nukleären Lokalisation der SAH-Hydrolase, und zur Co-Lokalisation mit der RNA-Polymerase II (Radomski et al. 1999; Kloor et al. 2007). Damit reguliert die SAH-Hydrolase die intrazelluläre und nukleäre Konzentration von SAH und beeinflusst so indirekt Transmethylierungsreaktionen. Der von Cantoni et al. (Cantoni et al. 1979) formulierte Quotient aus SAM und SAH, das Methylierungspotenzial (MP) wurde daher als sensibler Indikator für die Methylierungsaktivität innerhalb eines Gewebes angesehen. Je kleiner der Quotient ist, desto stärker werden Methylgruppenübertragungen gehemmt. Neoplastische oder durch onkogene Viren transformierte Zellen weisen unphysiologische Methylierungsmuster auf (Kanai et al. 2004; Howard et al. 2008). Durch eine Überexpression von DNA-Methyltransferasen kann eine Hypermethylierung von DNA-Abschnitten eintreten, die zur Expressionsrepression bei Genen führt, die wichtige Funktionen in der Zelle haben. In diesem Zusammenhang sind die Tumorsuppressorgene von besonderem Interesse (Kurash et al. 2008; Shima et al. 2011).

1.5. Abhängigkeit der Therapie vom Methylierungsstatus des MGMT-Promotors

Das Glioblastom ist der häufigste primäre Gehirntumor des Erwachsenen. Unter den ZNS Tumoren macht es ca. 50 % der Erkrankungen aus, die Inzidenz liegt bei 2,9-3,5 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner und Jahr (CBTRUS Statis-

tical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004–2006). Die Erkrankung ist in der Regel schnell progredient und endet letal. Gemittelt liegt die Zeitspanne des Gesamtüberlebens bei weniger als einem Jahr. Die aktuelle Standardtherapie bezogen auf eine Phase III-Studie, die durch die European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) und das National Cancer Institute of Canada (NCIC) durchgeführt wurde (Stupp et al. 2005), ist die lokale Bestrahlung kombiniert mit gleichzeitiger Chemotherapie mit TMZ (Weiler et al. 2010). Zuvor sollte die größtmögliche funktionserhaltende Resektion oder eine Biopsie erfolgen (Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie Stand 9/2011). Unter den Patienten, die eine Kombinationsbehandlung erhalten (Bestrahlung und Chemotherapie) konnte gezeigt werden, dass die Hypermethylierung der Promotorregion der MGMT mit einem verlängertem progressionsfreien Intervall bzw. Gesamtüberleben einhergeht (Hegi et al. 2005). Das MGMT-Gen ist auf dem Chromosom 10q26 lokalisiert, der Promotor enthält eine CpG-Insel, diese ist im 5'-Bereich des Gens (bp-552 bis +288) lokalisiert und umfasst 97 CpG-Elemente (Weller et al. 2010).

Als führende Substanz für die Chemotherapie hat sich Temozolomid (TMZ) etabliert. TMZ ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylantien. Die Methylierung des O⁶-Atoms des Guanins ist zwar nicht der Haupteffekt dieser Substanz, scheint aber mit dem größten zytotoxischen Effekt verbunden zu sein. In Abwesenheit von MGMT kumuliert O⁶-Alkylguanin in der DNA, es kommt zur inkorrekten Basenpaarung mit Thymin, die einen Reperaturmechanismus induziert, der wiederum die Apoptosekaskade anstößt. Die MGMT überträgt die durch Alkylantien zugefügten Methylgruppen von dieser O⁶-Position des Guanins auf einen internen Cysteinrest und unterbindet dies. Nach dieser Übertragung erlischt die Methyltransferasefunktion des Enzyms, weshalb es sich hier strenggenommen nicht um ein wirkliches Enzym handelt (Dempfle et al. 1982). Durch oben ausgeführte Umstände rückt die Beeinflussung des Methylierungsstatus des MGMT-Promotors in den Fokus pharmakologischen Interesses. Könnte man seine Methylierung forcieren, bestünde eventuell die Möglichkeit die Ansprechraten auf die Therapie mit TMZ positiv zu beeinflussen und hier-

durch das progressionsfreie Intervall bzw. Gesamtüberleben der Betroffenen zu erhöhen.

1.6 Ziel der aktuellen Untersuchungen

In dieser Arbeit wurden zwei Glioblastomzelllinien, LN-229 und TU 113, auf ihr MP und auf den Methylierungsstatus des MGMT-Promotors untersucht. Um die Bedeutung des MP für die MGMT-Promotormethylierung und die gesamte DNA-Methylierung zu untersuchen, wurde versucht das MP mit verschiedenen pharmakologischen Substanzen zu beeinflussen. Im ersten Teil wurden die Zellen mit SAM oder Methionin inkubiert, um das MP zu erhöhen. Im zweiten Teil erfolgte die Inkubation mit Adenosin-2'3'-Dialdehyd (Ado-2'3'-Dial), einem Hemmstoff der S-Adenosylhomocystein Hydrolase (SAHH). Hierdurch wird der Abbau von SAH gezielt gehemmt und damit durch steigende SAH-Konzentrationen das MP gesenkt. Um zu untersuchen, ob das MP mit Änderungen des Energiestoffwechsels in Zusammenhang steht, wurden auch die Konzentrationen der Adeninnukleotide bestimmt und die Energieladung berechnet.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Materialliste

Substanz/Handelsname	Hersteller
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Germany)
Adenosin	Sigma (Taufkirchen, Germany)
Adenosin-2'3'-dialdehyd	Sigma (Taufkirchen, Germany)
ADP	Boehringer (Mannheim, Germany)
AMP	Boehringer (Mannheim, Germany)
ATP	Boehringer (Mannheim, Germany)
DMEM	Cambrex (Vervier, Belgium)
DMSO	Merck (Darmstadt, Germany)
DNeasy Tissue Kit	Qiagen (Hilden, Germany)
dNTPs	PAN (Aidenbach, Germany)
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen (Hilden, Germany)
FCS	Biochrom (Berlin, Germany)
Festphasenextraktionssäulen Bond Elut	ICT (Frankfurt, Germany)
Heptansulfonsäure-Natriumsalz	Fluka (Buchs SG, Switzerland)
Hpall	Fermentas (St.Leon-Rot, Germany)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt, Germany)
K ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt, Germany)
Kulturschalen rund, 145x20 MM	Greiner Bio-One (Frickenhäusen, Germany)
L-Methionin	Sigma (Taufkirchen, Germany)
Methanol, HPLC grade	Merck (Darmstadt, Germany)
Methyladenosin	Sigma (Taufkirchen, Germany)
NH ₄ H ₂ PO ₄	Sigma (Taufkirchen, Germany)
PANScript Polymerase	PAN (Aidenbach, Germany)
PBS pH 7,2	Invitrogen (Karlsruhe, Germany)
PCS 0,6M	Merck (Darmstadt, Germany)
Penicillin 100 U/ml	Invitrogen (Karlsruhe, Germany)

SAH	Sigma (Taufkirchen, Germany)
SAM (S-Adenosyl-L-Methionin, 70 % Aktivität)	Sigma (Taufkirchen, Germany)
SssI Methyltransferase	New England Biolabs (Beverly(MA), USA)
Streptomycin 100µg/ml	Invitrogen (Karlsruhe, Germany)
Taq-DNA-Polymerase	PAN (Aidenbach, Germany)
Tetrabutylammonium-hydrogensulfat	Sigma (Taufkirchen, Germany)
Trypsin EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, Germany)

2.1 Zelllinien

Für die durchgeführten Experimente wurden humane Glioblastomzellen vom Typ TU 113 und LN-229 verwendet, die uns freundlicher Weise von Frau PD Dr. Ulrike Naumann (Hertie Institut Tübingen) zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich hierbei um adhärente, als Monolayer wachsende Zellen.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Als Standardmedium wurde Dublecco's modified eagle medium (DMEM) mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (1 h, 58 °C, FCS) und Penicillin (100 U/ml, Pen)/Streptomycin (100 µg/ml Strep) eingesetzt. Das Medium wurde für beide Zelllinien verwendet und alle 2-3 Tage erneuert.

Als Kulturgefäße dienten Flaschen (250 ml, 75 cm²) oder Schalen mit 15 cm Durchmesser. Die zur Kultivierung der Zellen verwendeten Medien und Substanzen wurden alle von Invitrogen bezogen.

2.2.2 Subkultivierung der Zelllinien

Beide Zelllinien wurden kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz subkultiviert, d. h. unter Verdünnung in ein neues Kulturgefäß überführt („passagiert“). Dies war bei den Zellen TU 113 alle 6-7 Tage, bei den LN-229 alle 4-5 Tage der Fall. Wegen der starken Adhärenz der Zellen wurden sie mit 2 ml, auf 37 °C vorgewärmter, Trypsin/EDTA-Lösung (1 %, Lösungsmittel PBS, pH 7,2) vom Boden der Kulturgefäße abgelöst. Um eine Inaktivierung des Trypsins durch FCS zu vermeiden wurde zunächst das alte Medium entfernt und der Zellrasen anschließend mit 5 ml PBS (pH 7,2) gespült. Nach Zugabe des Trypsins erfolgte eine zweiminütige Inkubation. Anschließend noch anhaftende Zellen wurden durch leichtes Klopfen auf die Seitenwand des Gefäßes abgelöst. Durch das Dazugeben serumhaltigen Mediums wurde die Trypsinreaktion gestoppt, gleichzeitig wird hierdurch das toxisch wirkende EDTA der Trypsinlösung gebunden.

Die Zellen wurden mit einer Pipette resuspendiert und bedarfsweise mit einer Kanüle vereinzelt. Nach Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer wurden sie anfangs mit einer Dichte von ca. $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² neu ausgesät. Später wurde die Zelllinie LN-229 im Verhältnis von 1:4 und die Linie TU 113 mit einem Verhältnis von 1:2 auf neue Kulturgefäße verteilt. Der nächste Mediumwechsel erfolgte 1-2 Tage nach dem Passagieren.

2.2.3 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen

Zur Kryokonservierung wurden konfluent wachsende Zellen abgelöst, in 10 ml Einfriermedium (Standardmedium mit 20 % FCS-Anteil) aufgenommen und 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Währenddessen wurden Kryoröhrchen mit 0,5 ml Einfriermedium B (DMEM + 10 % FCS + 20 % DMSO) bereitgestellt. Um die bei Raumtemperatur schädigende Wirkung des DMSO auf die Zellen einzugrenzen wurden die Röhrchen auf Eis gelagert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand in den Zentrifugenröhrchen bis auf ca. 0,5 ml abgesaugt, der Rest resuspendiert und in die vorbereiteten Kryoröhrchen überführt. Diese wurden zunächst bei -80 °C eingefroren, und nach ca. 24 h in einen Flüssigstickstoffbehälter (-196 °C) überführt.

Zur Revitalisierung wurden 10 ml Auftaumedium (dieses entspricht dem Einfriermedium) in 15 ml Falcons vorgelegt. Die Eppendorfhütchen mit den gefrorenen Zellen werden bei ca. 37 °C angewärmt, nach Verschwinden der letzten gefrorenen Anteile wird der Inhalt in die Falcons abpipettiert und anschließend bei 200 x g für 10 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml Auftaumedium resuspendiert. Das Medium mit den Zellen wurde in einer 75 cm² Flasche für 2 Tage inkubiert.

2.3 Inkubation der Zellen mit pharmakologischen Substanzen

Für die Versuche zur Beeinflussung des Methylierungspotenzials wurden die Zellen in Schalen kultiviert (14,5 cm Durchmesser, 2 cm Randhöhe; Greiner). Nach 4-7 Tagen waren sie nahezu konfluent gewachsen, so dass sie sich zur Passage eigneten. Nun wurde das alte Medium abgesaugt und neues, mit ei-

nem gewünschten pharmakologischen Wirkstoff versetztes, hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 24 h.

2.3.1 Inkubation der Zellreihe LN-229 mit S-Adenosylmethionin

Um das MP zu steigern, wurden Zellen der Reihe LN-229 direkt mit SAM-haltigen Medium inkubiert. Hierfür wurde initial SAM der Firma Sigma (Taufkirchen) entsprechend der gewünschten Endkonzentration von 1 mM eingewogen. Wegen der vom Hersteller angegebenen Aktivität von 70 % wurde die Menge um 30 % gesteigert. Die 1 mM Lösung wurde zur Herstellung der anderen Lösungen verdünnt wie in Tabelle 2.2 angegebenen.

Tabelle 2.2: Herstellung der SAM-haltigen Nährlösungen. Zunächst wurden 50 ml SAM 1 mM erstellt, anschließend erfolgte die Verdünnung zu Endkonzentrationen von 30 μ M und 300 μ M. Endvolumen jeweils 50 ml (SAM: 434,9 g/mol, Aktivität unseres Präparates 70 %)

SAM-Endkonzentration	SAM	Volumen DMEM
1 M	Einwaage 0,028 g	50 ml
30 μ M	1,5 ml SAM 1 mM	48,5 ml
300 μ M	15 ml SAM 1 mM	35 ml

2.3.2 Analyse des Abbaus von S-Adenosylmethionin im Nährmedium

Um Rückschlüsse darüber ziehen zu können, welchem spontanen Zerfall SAM unterliegt und ob und wenn ja in welchem Ausmaß SAM in die Zelle aufgenommen wird, wurden 200 μ l Proben jeder Konzentrationsstufe SAM-haltigen Mediums vor und nach Inkubation gewonnen. – Um die Auswirkung der Zellen auf die gemessenen SAM-Konzentrationen zu beobachten wurden neben den Proben nach Inkubation mit Zellen auch Proben von Medium untersucht, welches ohne Zellen inkubiert worden war. Die Inkubationszeit betrug jeweils 24 h. Die Proben wurden zunächst eingefroren und später gemessen.

2.3.3 Inkubation der Zellreihe TU 113 mit Methionin und Glukose

SAM wird von der Methionin-Adenosyl-Transferase aus ATP und Methionin synthetisiert. Im Zellstoffwechsel sind die Phosphatverbindungen des ATP eine Speicherform von Energie. Um ausreichend Energie für die Synthese von SAM zur Verfügung zu stellen wurden deshalb auch Konstellationen gewählt, in denen Glukose dem Medium zugesetzt wurde. Um die alleinige Wirkung der Glukose abzuschätzen zu können, wurden schlussendlich drei verschiedene Konstellationen für die Inkubation der Zellen TU 113 gewählt. Die Inkubation ausschließlich mit Methionin (Met 10 mM), ausschließlich mit Glukose 3 % (Glc 3 %) und mit einer Mischung aus beiden (Met. 10 mM + Glc 3 %) (s. Tab. 2.3). L-Methionin wurde von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Methionin- und Glukoselösungen.
(Methionin: 149 g/mol)

Hergestellte Lösung	Einwaage	Volumen DMEM
Methionin 10 mM	0,104 g	70 ml
Glukose 3 %	2,1 g	70 ml

2.3.3 Hemmung des Methylierungspotenzials durch Adenosin-2'3'-Dialdehyd

Um das Methylierungspotenzial zu verringern erfolgte die Inkubation mit dem SAH-Hydrolase Hemmstoff Adenosin-2'3'-Dialdehyd (Ado-2'3'-Dial) in einer Konzentration von 30 µmol/l (Tab. 2.4). In dieser Konzentration scheint es selektiv wirksam auf die SAH-Hydrolase und weniger toxisch als andere Hemmstoffe.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der mit Adenosin-2'3'-Dialdehyd versetzten Nährlösung. Zunächst wurde 1 mM Primärlösung hergestellt und anschließend mit reinem DMEM auf eine Konzentration von 30 µM verdünnt. (Ado-2'3'-Dial: 2,652 g/mol)

Hergestellte Lösung	Einwaage	Volumen DMEM
Ado-2'3'-Dial 1 mM	5 µmol → 0,013 mg	5 ml
Ado-2'3'-Dial 30 µM	2,4 ml Ado-2'3'-Dial 1 mM	77,6 ml

2.4 HPLC

2.4.1 Theoretische Grundlagen zur HPLC

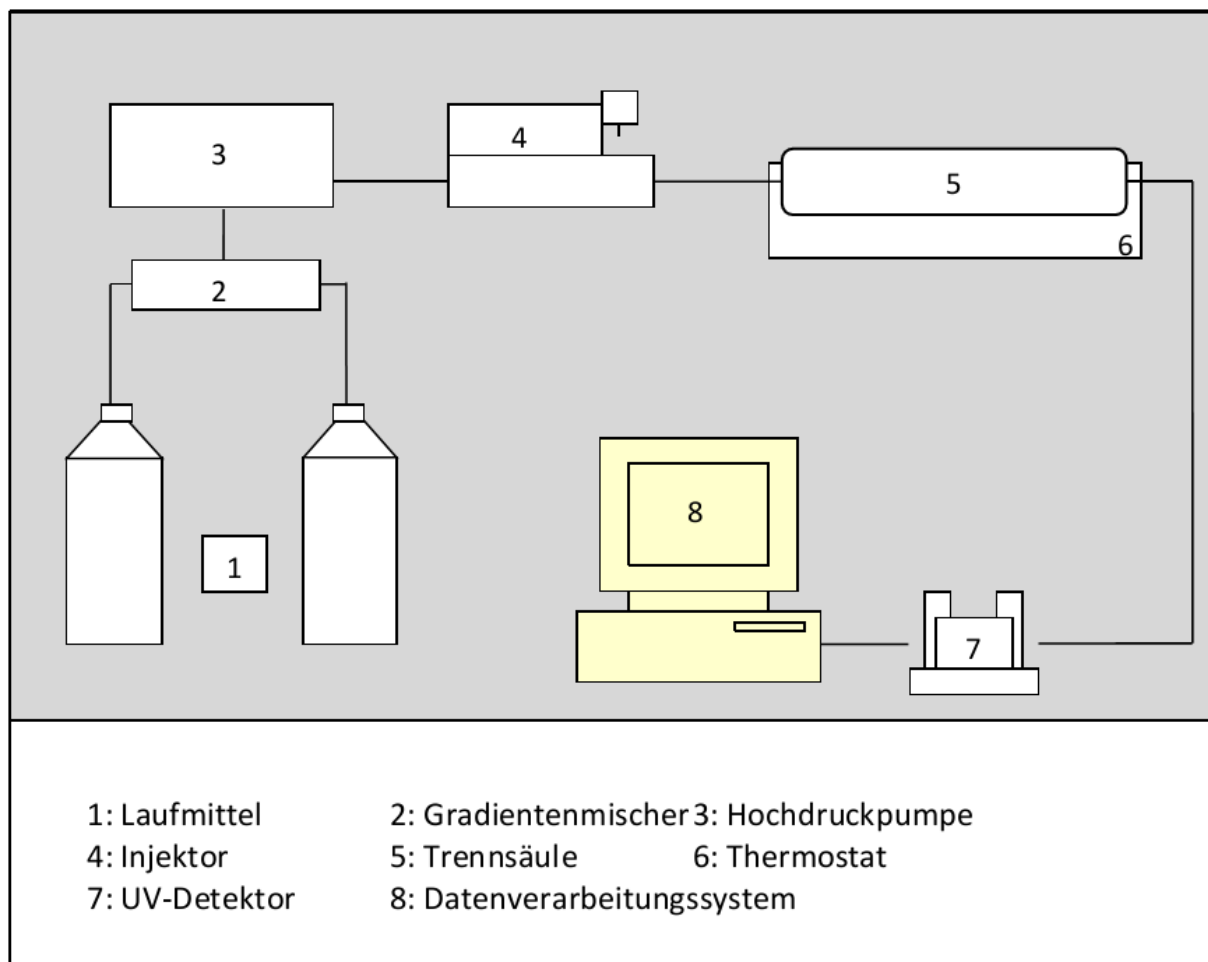
Unter dem Begriff Chromatographie werden physikalisch-chemische Trennmethode(n) zusammengefasst, die eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase bewirken (Schwedt 1994). Heute unterscheidet man grundsätzlich zwischen Gas- und Flüssigkeitschromatographie (*Liquid Chromatography*, LC), wobei der Phasenzustand der mobilen Phase der Einteilung zugrunde liegt. Eine besonders leistungsfähige Form der Flüssigkeitschromatographie ist die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (auch *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Bei dieser Methode können unter Verwendung kleiner Packungsteilchen von 1-25 µm in der Trennsäule und hohen Drücken hochauflösende Trennungen innerhalb kurzer Analysezeiten erreicht werden. Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und Probe werden verschiedene Trennkonstellationen unterschieden: „*normal-phase*“-Chromatographie, „*reversed phase*“ Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und Gelpermeationschromatographie. Zur Trennung unpolarer oder schwach polarer Substanzen wird die „*reversed phase*“-Chromatographie verwendet. Im Gegensatz zur „*normal phase*“-Chromatographie ist hier die stationäre Phase apolar und die mobile Phase polar. Als stationäre Phase werden dabei chemisch modifizierte Kieselgele eingesetzt, bei denen an die Silanolgruppen des Kieselgels apolare, organische Gruppen

gebunden sind. Die Trennung der verschiedenen Probenkomponenten beruht auf Wechselwirkungen zwischen der apolaren stationären Phase und den gleichsam apolaren Proben. Als mobile Phase werden Gemische aus H₂O und einem zweiten Lösungsmittel (z. B. Methanol, Acetonitril) verwendet.

2.4.2 Beschreibung des Messsystems

Folgend wird das verwendete HPLC-Messsystem beschrieben (s. Abb. 2.1). Da die Elution der Säule mit Hilfe eines Gradienten erfolgte, bei dem die Zusammensetzung der mobilen Phase, also des Laufmittels (1) kontinuierlich verändert wird, ist der Hochdruckpumpe ((3), S1000, Sykam, Gilching) ein

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Komponenten der HPLC-Apparatur (nach M. Hermes).



Gradientenmischer (2) vorgeschaltet. Die mobile Phase setzt sich sowohl bei der Messung der Adeninnukleoside als auch der Adeninnukleotide aus zwei verschiedenen Eluenten zusammen (s. Tab. 2.5) und wird mit einer Flussrate von 1 ml/h über die Säule geleitet. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde stets ein linearer Gradient verwendet. Die Auftragung der Proben auf die Säule erfolgt durch einen Autosampler/Injektor (4) (Marathon, Spark Holland, Emmen, Niederlande), wobei das eingesetzte Probenvolumen 30 µl betrug. Als stationäre Phase diente in beiden Fällen eine Gromsil 120 ODS-3 CP-Säule 5 µm, 125 x 4 mm (5) (Grom, Herrenberg), deren Temperatur durch ein

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der Laufmittel für die Elution der Adeninnukleoside und Adeninnukleotide. Zur Herstellung der Laufmittel wurden ausschließlich Lösungsmittel der Firma Merck der Reinheitsstufe „gradient grade“ verwendet, die sich somit für die Laufmittelherstellung eignen. Da das Eluent luftblasenfrei sein muss, wurde es im Ultraschallbad für 5 min. entgast

Lösung	Komponenten	Menge	Konzentration
Laufmittel A für Adeninnukleoside	NH ₄ H ₂ PO ₄	1,15 g/l	10 mM
	Heptansulfonat	0,132 g/l	0,6 mM
	Methanol	30 ml/l	3 %
Laufmittel B für Adeninnukleoside	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,575 g/500 ml	10 mM
	Heptansulfonat	0,066 g/500 ml	0,6 mM
	Methanol	15 ml/500 ml	3 %
	Acetonitril	50 ml/500 ml	10 %
Laufmittel A (LMA) für Adeninnukleotide	KH ₂ PO ₄ (66 mM)	800 ml/l	52 mM
	K ₂ HPO ₄ (66 mM)	220 ml/l	14 mM
	Acetonitril	3 ml/l	0,3 %
	Tetrabutylammonium- hydrogensulfat	1,698 g/l	5 mM
Laufmittel B (LMB) für Adeninnukleotide	LMA für Adeninnukleotide	300 ml	
	Acetonitril	200 ml	40 %

Thermostat (6) bei 30 °C konstant gehalten wurde. Nach Auftrennung der Proben wurden die verschiedenen Komponenten mit Hilfe eines UV-Detektors (7) (Modell 204, Linear Instruments, Fremont, USA) bei 254 nm detektiert. Die Steuerung des Autosamplers, Gradientenmischers und der Pumpe sowie die Auswertung der Daten erfolgte PC-gestützt mit Hilfe der Software Peak Simple 3.12 (8) (SRI. Inc.).

2.4.3 Die Weitere Aufbereitung der Zellen für die Messung mit der HPLC

Die in der HPLC gemessenen Konzentrationen werden hier in Nanomol pro 1×10^7 Zellen dargestellt. Anhand einer von sechs Proben pro Versuch wurde eine repräsentative Zellzahl bestimmt, die Zellen mussten hierfür intakt bleiben und wurden deshalb mit Trypsin vom Gefäßboden abgelöst (trypsinisiert). Alternativ wurden die Zellen direkt mit Perchlorsäure(PCS) lysiert und mit dem Zellschaber abgeerntet. In ersten Probemessungen fiel auf, dass je nach Aufbereitungsart ((zuerst) Trypsinieren oder (direkt) PCS-lysieren) unterschiedliche Konzentrationen der Zielsubstanzen nachzuweisen waren, so wurden zum Vergleich alle Versuche zum Einen mit initial trypsinisierten, zum Anderen mit direkt PCS-lysierten Zellen durchgeführt. Bei allen Proben wurde das Medium abgesaugt und anschließend der Zellrasen mit 10 ml PBS (pH 7,2) gespült, um Mediumreste zu entfernen.

2.4.4 Trypsinieren der Zellen

Die Zellen wurden durch zweiminütige Inkubation mit auf 37 °C vorgewärmten Trypsin/EDTA vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und die Trypsinreaktion anschließend mit 10 ml Standardnährmedium gestoppt. Das Medium/Zellengemisch wurde abpipettiert, um kleinste Reste verbliebener Zellen zu gewinnen wurde die Kulturschale noch mit 5 ml Medium gespült. Nach Durchmischung wurden ein Volumen von 200 µl für die Zellzählung abpipettiert und der Rest bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 1 ml PBS aufgelöst, dann nochmals für 2 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes folgte das Lysieren der Zellen mit 1,2 ml 4 °C kalter 0,6 molarer Perchlorsäure, anschließend wurde die Probe zwischen den

einzelnen Arbeitsschritten auf Eis gelagert, um einer Verfälschung der Messergebnisse durch spontanen Zerfall der Messprodukte entgegenzuwirken.

2.4.5 Direktes Lysieren der Zellen mit Perchlorsäure 0,6M

Beim direkten PCS-Lysieren wurde nach dem Spülen mit PBS der Zellrasen direkt mit PCS-versetzt und mit dem Schaber vom Gefäßboden gelöst. Das entstandene Gemisch wurde anschließend in ein EPI abpipettiert und mit PCS auf 2 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe zwischen den einzelnen Arbeitsschritten ebenfalls auf Eis gelagert. Ab diesem Zeitpunkt wurden beide Probenarten, trypsinierte, wie PCS-lysierte, identisch weiterverarbeitet.

Zunächst wurden sie ultraschallgebrochen und die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 14.000 U/min für 10 min separiert. Ein Aliquot (1 ml) des sauren Überstandes wurde nach Zugabe von Methyladenosin (Sigma) als interner Standard (s. Abschnitt 2.4.9) mit Kaliumlösung (K_2CO_3 , Konzentration 2 mol/l und KH_2PO_4 , Konzentration 1 mol/l im Verhältnis 1:1 gemischt) auf pH 5-6 titriert. Der Rest des perchlorsauren Überstandes wurde für die Bestimmung der Adeninnukleotide bei -80 °C eingefroren. Das ausfallende Perchlorat wurde durch erneutes Zentrifugieren (5 min, 20 000 x g, 4 °C) abgetrennt und der Überstand durch Festphasenextraktion aufkonzentriert und gereinigt.

2.4.6 Festphasenextraktion

Die zur Festphasenextraktion verwendeten Phenylboronatsäulen (BondElut, ICT, Bad Homburg, Deutschland) binden bei pH-Werten >5 Verbindungen, die zwei cis-ständige OH-Gruppen besitzen. Die Säulen wurden vor Verwendung mit 0,1 M HCl gespült und mit 0,1 M Ameisensäure solvatisiert, um eine kovalente Bindung der Nukleoside zu ermöglichen. Anschließend wurde die Säule mit Tris (0,02 M, pH 7,5)/Methanol (Verhältnis 7:3) äquilibriert und die Probe auf die Säule gegeben. Mit 1 ml Natriumcitratpuffer (10 mM, pH 8,8) wurde die Säule gespült. Die an die Säule gebundenen Metabolite werden mit 500 µl 0,1 M HCl eluiert und in die HPLC injiziert.

2.4.7 Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung der Adeninnukleotide

Ein Aliquot von 200 µl des perchlorsauren Überstandes (aus 2.4.4 u. 2.4.5) wurde mit Kaliumlösung auf pH 8 titriert und nach Inkubation bei Raumtemperatur (10 min) abzentrifugiert (5 min, 20 000 x g). Der Überstand wurde anschließend in die HPLC injiziert. Ein Aufkonzentrieren mit Festphasenextraktion war nicht notwendig.

2.4.8 Bestimmung der S-Adenosylmethionin Konzentration der Nährmedien vor und nach Inkubation

Die in 2.3.2 entstandenen Proben waren zunächst bei -80 °C eingefroren worden und wurden zu einem späteren Zeitpunkt mittels HPLC analysiert. Hierfür wurden sie bei 4 °C aufgetaut, mit einem „Rüttler“ (Vortex) mechanisch durchmischt und anschließend 10 µl der Lösung in bereitgestellte Eppendorfhütchen mit 490 µl Tris/HCL (pH 7,4) abpipettiert. Nach erneutem Vortexen erfolgte die Bestückung von HPLC-Vials mit 200 µl der entstandenen Lösung.

2.4.9 Eichung des Messsystems und interne Standardisierung

Da die Konzentration der Metabolite vom UV-Detektor nur relativ als Peakfläche registriert wird, muss für jeden Metabolit eine Eichung durchgeführt werden. Anhand der bei der Eichung erhaltenen Beziehungen zwischen der vorliegenden Metabolitkonzentration eines Standards und der Peakfläche kann der stoffspezifische Eichfaktor der gemessenen Substanz bestimmt werden. Zur Ermittlung des Eichfaktors wurde ein Standard mit definierten Mengen der zu messenden Substanzen verwendet. Für die Messung von SAM, SAH und Ado wurde dieser Standard als 1mM Stammlösung hergestellt und später für die Erstellung der endgültigen Standards verdünnt (s. Tab. 2.6). Die Stammlösung wurde bei -20° eingelagert. Neben SAM, SAH und Ado enthielt er außerdem Methyladenosin als Eichsubstanz des internen Standards (s.u.). Zur Herstellung wurden die entsprechenden Substanzen der Firma Sigma bzw. Boehringer Mannheim verwendet. Als Lösungsmittel für die Stammlösung diente Tris/HCL (20 mM, pH 7,4). Vor der Messung wurden durch Verdünnung mit Perchlorsäu-

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der Basislösung des HPLC Standards für die Messung von SAM, SAH und Ado (Lösungsmittel Tris/HCL pH 7,0). Die angegebenen Mengen beziehen sich auf 10 ml Basislösung. Die jeweilige Lösung wurde für die Versuche auf eine Konzentration von 1 μ M verdünnt. Das verwendete SAM wurde bei -20 °C gelagert.

Substanz	Einwaage	Endkonzentration
SAM, 70 % Aktivität	57 mg	1 mM
SAH	38 mg	1 mM
Adenosin	27 mg	1 mM
Methyladenosin	28 mg	1 mM

re (0,6M) 2 ml Messstandard in Endkonzentration 1 μ mol/l hergestellt und diese anschließend analog zu normalen Proben auf einen pH von 5-6 titriert, zentrifugiert und der Festphasenextraktion unterworfen (s. Abschnitt 2.4.5 und 2.4.6). Die Peakfläche wurde gegen die Konzentration der Substanz aufgetragen und mit Hilfe der linearen Regression eine Eichgerade bestimmt. Anhand dieser Eichgeraden lässt sich nun die Metabolit-Konzentration einer unbekannten Probe bestimmen. Für die Messung der Adeninnukleotide wurden 2 ml eines 20 μ M Standards von AMP, ADP und ATP erstellt (s. Tab. 2.7). Als Lösungsmittel diente KH_2PO_4 (6,6 mM, pH 4,8). 2 ml dieser Mischung wurden mit Kaliumlösung auf einen pH von ca. 8 titriert und anschließend bei 14 000 U/min für 5 min zentrifugiert und in HPLC Vials pipettiert. Zur Herstellung wurden die entsprechenden Substanzen der Firma Sigma bzw. Boehringer Mannheim verwendet, eine Festphasenextraktion war hier nicht notwendig. Neben den externen Standards wurde auch ein interner Standard verwendet. Bei der Festphasenextraktion ist ein quantitativer Verlust der Metabolite nicht auszuschließen. Aus diesem Grund wurden alle Proben, die der Festphasenextraktion unterworfen wurden vor der Titration mit dem nicht physiologischen Adenosinanalogen Methyladenosin (Endkonzentration 100 μ M) versetzt. Anhand des Schwundes des Methyladenosins kann der prozentuale Verlust durch Festphasenextraktion

Tabelle 2.7: Zusammensetzung des HPLC Standard für die Messung der Adeninnukleotide (Lösungsmittel KH_2PO_4 (6,6 mM, pH 4,8). Die angegebenen Mengen beziehen sich auf 10 ml Lösung. Die jeweilige Lösung wurde für die Versuche auf eine Konzentration von 20 μM verdünnt.

Substanz	Einwaage	Endkonzentration
AMP	5 mg	1 mM
ADP	5 mg	1 mM
ATP	6,1 mg	1 mM

bestimmt werden. Mit dem gefundenen Wert wurden die gemessenen Metabolitkonzentrationen korrigiert.

2.4.10 Massenspektroskopische Bestimmung von Methylthioadenosin

Während der Messungen zeigte sich wiederholt ein auffallend großer Peak bei einer Retentionszeit von ca. 22 Minuten. Dies war besonders unter Inkubation der Zelllinie LN-229 unter SAM in steigender Konzentration beobachtbar. Hierauf wurden zur Analyse des Stoffes, während des Auftretens des Peaks, unter der laufenden chromatographischen Testung, Proben entnommen und später massenspektroskopisch untersucht: Die Messungen wurden freundlicherweise von Mark Stahl vom Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen in Tübingen durchgeführt.

2.4.11 Messung der Adeninnukleotide mittels HPLC

Die Proben zur Messung der Adeninnukleotide, waren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und wurden nun bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. 200 μl je Probe wurden ebenfalls mit Kaliumlösung auf einen pH von ca. 8,0 titriert, zentrifugiert und in HPLC Vials gegeben. Eine Festphasenextraktion war nicht notwendig.

2.4.12 Berechnung des EC nach Atkinson und Walton

Aus den mittels HPLC ermittelten Konzentrationen von AMP, ADP und ATP wurde die Energieladung (*Energy Charge*, EC) der Zellen berechnet, welche

unter Normalbedingungen in einem Bereich von 0,75-0,95 liegen sollte (Atkinson and Walton 1967)

Die EC errechnet sich wie folgt:

$$EC = \frac{[ATP] + 0,5[ADP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]}$$

Die EC stellt die Hälfte der durchschnittlich abspaltbaren Phosphatgruppen pro Adeninrest dar (Atkinson 1968). Atkinson und Walton leiteten die EC als metabolischen Regulationsparameter ab, nachdem klar wurde, dass sich der Energiehaushalt der Zelle, nicht allein anhand der Konzentrationen von AMP, ADP oder ATP darstellen lässt. Vielmehr besteht ein komplexes regulatorisches Verhältnis der einzelnen in den Energiehaushalt der Zelle eingreifenden Metabolite. Durch Beobachtungen verschiedener Enzymaktivitäten im Verhältnis zur EC konnte gezeigt werden, dass sich die Regulierung des Energiehaushaltes letztlich an der Zahl der zur Verfügung stehenden abspaltbaren Phosphatgruppen orientiert und anderen eng regulierten metabolischen Prozessen entspricht. Analog bedeutet ein Abfall des EC eine Entgleisung des Energiestoffwechsels.

2.5. Agarosegelelektrophorese

2.5.1 DNA-Isolation

Zur Präparation der genomischen DNA wurden ca. 5×10^6 Zellen der Gruppe LN-229 bzw. TU 113 mit Hilfe von Trypsin vom Boden einer Kulturschale gelöst, abzentrifugiert (200 x g, 10 min, 20 °C) und mit PBS gewaschen. Die anschließende DNA-Isolation erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit von Quiagen nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Die DNA-Konzentration der Proben wurde photometrisch gemessen und die Unterschiedlichen Fraktionen der isolierten DNA durch Gelchromatographie aufgetrennt.

2.5.2 DNA Konzentrationsbestimmung

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion der Probe bei 260 nm gemessen. DNA wurde 1:10 in Na₂HPO₄-Puffer (2 mM, pH 8,4) verdünnt. Bei 260 nm entspricht ein Extinktionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml (Brown 1996).

2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung

1 µg DNA wurden unter Verwendung von 6 x DNA-Gelladepuffer (Tab 2.8) in einem 1,5 %-Agarose-1 x TAE-Gel (+ 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) in 1 x TAE-Puffer (Tab. 2.9) elektrophoretisch bei 100 V aufgetrennt.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung Gelladepuffers für die in 2.5.3 beschriebene elektrophoretische Auftrennung der DNA.

Komponente	Menge
1 x TAE	500 µl
Glycerin	500 µl
Bromphenolblau	2 Körnchen

Tabelle 2.9: Zusammensetzung von TAE-Puffer für die elektrophoretische Auftrennung der DNA.

Komponenten	Menge/Liter	Konzentration
Tris	242,0 g	2 M
Acetat	57,1 ml	1 M
0,5 M EDTA-Lsg. (pH 8,0)	100,0 ml	50 mM

2.6 Nachweis der globalen DNA-Methylierung mittels Cytosin-Extension-Assay

2.6.1 Prinzip des Cytosin-Extension-Assays

Der Grad der DNA-Methylierung wurde mittels Cytosin-Extension-Assay, wie in der Literatur ausführlich beschrieben (Pogribny et al. 1999), bestimmt. Diese Methode basiert auf der Verwendung methylierungssensitiver Restriktionsendonukleasen, welche an nicht-methylierten Erkennungssequenzen einen 5'-Guanosin-Überhang bilden (s. Abb. 2. 2). In einer anschließenden Einzelnukleotid Verlängerungsreaktion wird durch eine DNA-Polymerase an diesen Überhängen ein radioaktiv markierter Cytosinrest in die DNA eingebaut. Der Grad des Einbaus von ^3H -dCTP an diesen Sequenzen reflektiert den Anteil nicht-methylierter Cytosinreste in der DNA. Da die Erkennungssequenzen des hier verwendeten Restriktionsenzym *HpaII* zufällig im Genom verteilt sind, kann mit Hilfe dieses Enzyms die globale DNA-Methylierung bestimmt werden. Ist die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym hingegen nicht zufällig im Genom verteilt, sondern vorwiegend in CpG-Inseln lokalisiert, kann mit dieser Methode auch der Methylierungsgrad von CpG-Inseln bestimmt werden. Wird die Radioaktivität der Probe bestimmt, sie ist umgekehrt proportional dem Methylierungsgrad der DNA.

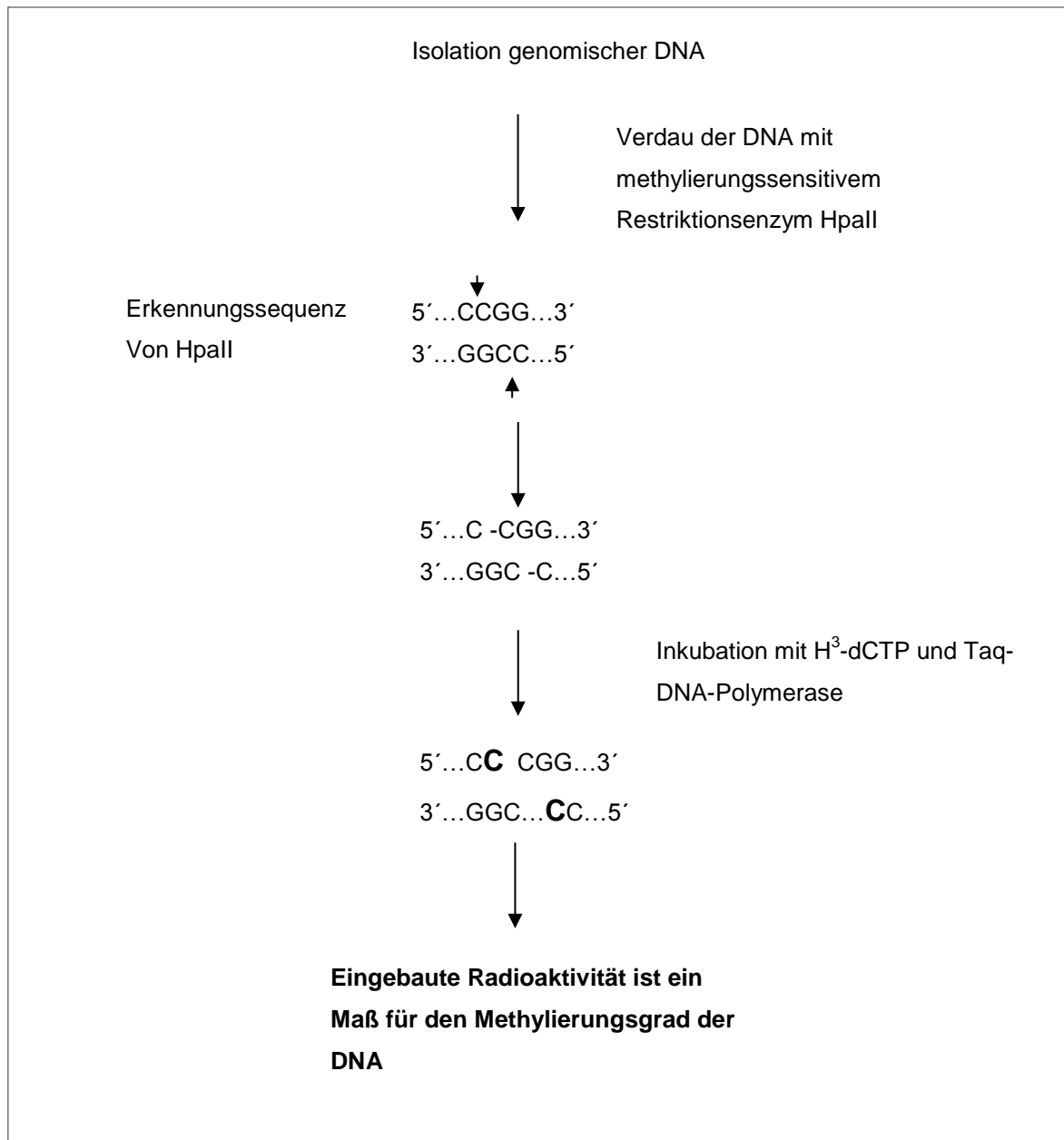
2.6.2 Isolation genomischer DNA

Zur Präparation der genomischen DNA wurden ca. 5×10^6 Zellen der Gruppe LN-229 bzw. TU 113 mit Hilfe von Trypsin vom Boden einer Kulturschale gelöst, abzentrifugiert (200 x g, 10 min, 20 °C) und mit PBS gewaschen. Die anschließende DNA-Isolation erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit von Qiagen nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll.

2.6.3. Gelelektrophoretische Auftragung von DNA

Zur Überprüfung der DNA-Qualität wurden 1 µg DNA wie unter 2.5.4 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt.

Abb. 2. 2: Prinzip des Cytosin-Extension-Assays: Das Restriktionsenzym HpaII spaltet die DNA an einer zufällig im Genom verteilten Erkennungssequenz, die nicht methyliert sein darf. Anschließend erfolgt der Einbau radioaktiv markierten H^3 -dCTP an den Restriktionsstellen durch Inkubation mit Taq-Polymerase.



2.6.4 Cytosin-Extension-Assay

Für den Restriktionsverdau wurden 2 µg genomische DNA mit 20 U der Endonuklease HpaII (Fermentas) und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 15 h bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Restriktionsenzym erfolgte durch Inkubation bei 65 °C für 20 min. Als Kontrolle diente ein zweites DNA-Aliquot, das ohne Restriktionsenzym inkubiert wurde. Anschließend wurde die Einzelnukleotid-Verlängerungsreaktion in einem 25 µl Reaktionsmix, welcher 0,5 µg DNA, 1x PCR-Puffer, 1,0 mM MgCl₂, 0,25 U PanScript Polymerase enthielt durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 56 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Aus jedem Ansatz wurden Aliquots von 10 µl (0,2 µg DNA) auf einen DE-81 Ionenaustauschfilter (Whatman) pipettiert. Diese wurden in einer Filtrationsapparatur (Osswald 1999) 3-mal mit 3 ml 0,5 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und getrocknet. Durch anschließende Szintillationszählung der Filter in 3 ml Ultima Gold wurde die am Filter gebundene Radioaktivität bestimmt. Der Einbau von radioaktiv markiertem ³H-dCTP in HpaII verdauter DNA wird durch Subtraktion des Signals unverdauter Proben von dem HpaII verdauter Proben errechnet und das Ergebnis als relativer ³H-dCTP-Einbau/µg DNA ausgedrückt.

2.7. Bestimmung der MGMT-Promotormethylierung

Das DNA-Reperaturenzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase schützt Zellen gegen den zytotoxischen Effekt alkylierender Substanzen, die Aktivität der MGMT erscheint bei Hypermethylierung der Promotorregion des MGMT häufig supprimiert.

Letztlich soll die Beeinflussung des MP zu einer veränderten Aktivität der DNMT abhängigen DNA Methylierung führen und die Beeinflussung der Promotormethylierung der MGMT ist ein potentiell pharmakologisches Ziel. Der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors wurde durch Bisulfit-Sequenzierung dargestellt.

2.7.1 Bisulfit-Sequenzierung

Die Bisulfit-Sequenzierung beruht darauf, dass in Bisulfit (=Natriumhydrogensulfit)-behandelter DNA nicht methyliertes Cytosin zu Uracil deaminiert wird, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt. Es entstehen also unterschiedliche Basenabfolgen für methylierte und unmethylierte DNA. In einer anschließenden PCR-Reaktion werden die Primer so gewählt, dass entweder Methylierte oder unmethylierte Sequenzen amplifiziert werden. Uracil wird hierbei als Thymin abgelesen, während Methylcytosin als Cytosin erkannt wird und so korrekt in der Basenabfolge erscheint. Für die Natriumhydrogensulfit-Behandlung wurde das EpiTect Bisulfite Kit von Quiagen nach Maßgabe des Herstellers verwendet. Als Positivkontrolle diente Sssl-Methyltransferase behandelte Lymphozyten DNA. Die DNA eines normalen menschlichen Lymphozyten, die in aller Regel vollständig unmethyliert ist, diente als Negativkontrolle (Grasbon-Frodl et al. 2007; Mollemann et al. 2005; Esteller et al. 2000). Die Amplifizierten Sequenzen wurden anschließend gelchromatografisch aufgetrennt.

2.8. Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Instat. Dabei wurden die Abweichungen in den Datensätzen mittels statistischer Tests (t-Test für unverbundene Stichproben, Student's t-Test bzw. Welch's alternate t-Test) auf ihre Signifikanz hin überprüft (*=> $p < 0,05$; **=> $p < 0,01$; ***=> $p < 0.001$). Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Aufarbeitung der Zellen für die Bestimmung des Methylierungspotenzial

Grundsätzlich wurden aus der Notwendigkeit, bedarfsweise die Zellen zählen zu können, zwei unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden verwendet. Die Bestimmung der Metabolite SAM, SAH und Adenosin aus den Zellen mittels HPLC erforderte hier immer deren Extraktion mit Perchlorsäure (PCS). Um zählbare intakte Zellen zu erhalten wurden die Zellen einer Aufarbeitungsart mit Trypsin abgelöst und erst später mit PCS lysiert, so dass dazwischen Proben für die Zählung gewonnen werden konnten. Im zweiten Ansatz wurden die Zellen direkt mit PCS lysiert und mit dem Zellschaber abgeerntet. Das PCS-Lysieren stoppt enzymatischen Reaktionen und somit auch den Abbau von SAM, wodurch die zu messenden Stoffkonzentrationen möglichst nahe dem physiologischen Bereich bleiben. Alle Untersuchungen wurden an den Glioblastomzelllinien LN-229 und TU 113 durchgeführt.

Tabelle 3.1 Einfluss der Aufarbeitungsmethoden auf die Konzentrationen von SAM, SAH und Adenosin. Die Zellen LN-229 und TU 113 wurden für 24 h im Standardmedium kultiviert. Die Aufarbeitung erfolgte entweder durch Trypsinieren der Zellen mit anschließender Lyse oder durch direkte Lyse mit PCS. Die Bestimmung der Metabolite erfolgte mittels HPLC, wie in Kapitel 2.4 beschrieben. Dargestellt sind $MW \pm SEM$ aus n unabhängigen Experimenten in $nmol/10^7$ Zellen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Zelllinie	tryp/pcs	n	SAM	SAH	Ado	MP
LN-229	tryp	6	$1,2 \pm 0,4$	$0,07 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,02$	$17,3 \pm 2,3^{***}$
LN-229	pcs	6	$1,1 \pm 0,3$	$0,03 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$40,9 \pm 12,8^{***}$
TU 113	tryp	6	$2,6 \pm 0,4$	$0,19 \pm 0,04^{***}$	$0,26 \pm 0,05$	$14,1 \pm 3,0$
TU 113	pcs	6	$2,3 \pm 0,2$	$0,10 \pm 0,03^{***}$	$0,19 \pm 0,05$	$25,0 \pm 5,8$

Wie aus Tabelle 3.1 entnommen werden kann, weist nur die SAM-Konzentration in den beiden Zelllinien ähnliche Werte auf, unabhängig der Aufarbeitungsmethode. SAH zeigt bei beiden Zelllinien deutlich höhere Werte, wenn vor der PCS-Lyse noch die Trypsinierung erfolgte. Dementsprechend kommt es bei den trypsinierten Zellen zu einer signifikanten Reduktion des MP. Auch die Ado-Konzentration zeigt beim Trypsinieren tendenziell höhere Werte.

3.2. Beeinflussung des Methylierungspotenzials

Das MP ist ein Maß für die Transmethylierungsaktivität der Zellen, unter einem gesteigerten MP sollte eine Zelle also eine ungestörte Methylierungsaktivität zeigen, während ein erniedrigtes MP nachweislich mit einer Verringerung der globalen Methylierungsaktivität einhergeht (Hermes 2004a). Unter der Hypothese, dass eine gesteigerte Methylierungsaktivität sich auch im Zellkern bis zur Methylierung der DNA fortsetzt, sollte das MP gesteigert werden, um letztlich auch eine Hypermethylierung des MGMT-Promotors zu bewirken.

3.2.1 Inkubation der Zellen LN-229 mit S-Adenosylmethionin

Ein Ansatz das MP zu steigern war die Zellen der Linie LN-229 mit SAM in steigenden Konzentrationen (30 μM -1 mM) zu kultivieren. Eine Erhöhung der SAM-Konzentration um den Faktor 1.7 kann bereits bei 300 μM SAM im Kulturmedium beobachtet werden, wenn die Zellen trypsiniert und anschließend PCS-lysiert werden (LN-229 Kontrolle, try: $1,2 \pm 0,4 \text{ nmol}/10^7$ Zellen; LN-229 SAM 300 μM , try: $2,0 \pm 0,4 \text{ nmol}/10^7$ Zellen). Die Erhöhung von SAM in der Zelle ist bei dieser SAM-Konzentration im Medium umso deutlicher, Faktor 3.6, wenn die Zellen nur PCS-lysiert werden (LN-229 Kontrolle, pcs: $1,1 \pm 0,3 \text{ nmol}/10^7$ Zellen; LN-229 SAM 300 μM , pcs: $4,0 \pm 1,8 \text{ nmol}/10^7$ Zellen). Eine Steigerung der SAM-Konzentration im Medium bis 1 mM führt auch zu einem weiteren Anstieg der SAM-Konzentration in den Zellen, unabhängig von der Aufarbeitungsmethode, wobei die direkt PCS-lysierten Zellen auch hier einen höheren Wert aufweisen (s. Tab. 3.2). Parallel zum SAM-Spiegel steigt auch der SAH-Spiegel in den PCS-lysierten Zellen auf das 3-fache (LN-229 Kontrolle, pcs: $0,03 \pm 0,02 \text{ nmol}/10^7$ Zellen; LN-229 SAM 300 μM , pcs: $0,11 \pm 0,06 \text{ nmol}/10^7$ Zellen),

Tabelle 3.2 Veränderung der SAM-, SAH- und Ado-Konzentration durch SAM. Zellen der Linie LN-229 wurden für 24 h mit SAM in steigenden Konzentrationen kultiviert. Die Aufarbeitung erfolgte entweder durch Trypsinieren der Zellen mit anschließender Lyse oder durch direkte Lyse. (s. Kap. 2.4.4 u. 2.4.5). Die Bestimmung der Metabolite erfolgte mittels HPLC, wie in Kapitel 2.4 beschrieben. Dargestellt sind $MW \pm SEM$ aus n unabhängigen Experimenten in $nmol/10^7$ Zellen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Zelllinie	Messung	tryp/pcs	n	SAM	SAH	Ado	MP
LN-229	Kontrolle	tryp	6	$1,2 \pm 0,4$	$0,07 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,02$	$17,3 \pm 2,3$
LN-229	Kontrolle	pcs	6	$1,1 \pm 0,3$	$0,03 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$40,9 \pm 12,8$
LN-229	SAM 30	tryp	3	$1,4 \pm 0,1$	$0,08 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,02$	$18,4 \pm 1,5$
LN-229	SAM 30	pcs	4	$1,7 \pm 0,1^*$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$59,1 \pm 11,4$
LN-229	SAM 300	tryp	3	$2,0 \pm 0,4$	$0,13 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,03$	$15,0 \pm 0,9$
LN-229	SAM 300	pcs	4	$4,0 \pm 1,8^{***}$	$0,11 \pm 0,06^{**}$	$0,05 \pm 0,03^*$	$38,0 \pm 4,7$
LN-229	SAM 1 mM	tryp	4	$2,7 \pm 1,0$	$0,2 \pm 0,1^{**}$	$0,15 \pm 0,06$	$15,0 \pm 3,9$
LN-229	SAM 1 mM	pcs	4	$5,8 \pm 2,0^{***}$	$0,19 \pm 0,06^{**}$	$0,10 \pm 0,04^*$	$29,3 \pm 2,7^*$

bzw. das 6-fache (LN-229 Kontrolle, pcs: $0,03 \pm 0,02$ $nmol/10^7$ Zellen; LN-229 SAM 1 mM, pcs: $0,19 \pm 0,06$ $nmol/10^7$ Zellen) des Kontrollwertes an. Die Ado-Konzentration wird hingegen erst ab der SAM-Konzentration von 1 mM gegenüber der Kontrolle signifikant beeinflusst. Da die SAH-Konzentration mehr als die SAM-Konzentrationen ansteigt, fällt das MP abhängig von der zugesetzten SAM-Konzentration.

3.2.2 Inkubation der Zelllinie TU 113 mit Methionin und/oder Glukose

Eine weitere Veränderung der SAM-Konzentration wurde durch die Applikation von Methionin bzw. Methionin plus Glukose oder nur Glukose angestrebt. SAM wird von der Methionin-Adenosyl-Transferase aus ATP und Methionin synthetisiert. Somit könnte Methionin die Synthese von SAM stimulieren. Vor dem Hintergrund, dass Glukose den ATP-Gehalt der Zelle steigert, wurden die Zellen

Tabelle 3.3 Intrazelluläre Konzentrationen von SAM, SAH und Ado, sowie das MP der Zelllinie TU 113 nach 24-stündiger Inkubation mit Methionin 10 mM, Methionin 10 mM und Glukose 3 % oder nur mit Glukose 3 %. Die Aufarbeitung erfolgte entweder durch Trypsinieren der Zellen mit anschließender Lyse oder durch direktes PCS-Lysieren (s. Kap. 2.4.4 u. 2.4.5). Die Bestimmung der Metabolite erfolgte mittels HPLC, wie in Kapitel 2.4 beschrieben. Dargestellt sind $MW \pm SEM$ aus n unabhängigen Experimenten in $nmol/10^7$ Zellen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Zelllinie	Messung	tryp/ pcs	n	SAM	SAH	Ado	MP
TU 113	Kontrolle	tryp	6	$2,6 \pm 0,4$	$0,19 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,05$	$14,1 \pm 3,0$
TU 113	Kontrolle	pcs	6	$2,3 \pm 0,2$	$0,10 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,05$	$25,0 \pm 5,8$
TU 113	Met10	tryp	3	$2,5 \pm 0,3$	$0,17 \pm 0,1$	$0,26 \pm 0,2^{**}$	$17,9 \pm 9,6^*$
TU 113	Met10	pcs	3	$4,1 \pm 2,4^{***}$	$0,28 \pm 0,21^{***}$	$0,26 \pm 0,28^{**}$	$20,4 \pm 12,1$
TU 113	Met10+Glc3	tryp	2	$1,9 \pm 0,1$	$0,06 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,08$	$33,6 \pm 15,3^*$
TU 113	Met10+Glc3	pcs	2	$4,9 \pm 4,1^{***}$	$0,27 \pm 0,27^{***}$	$0,28 \pm 0,33^{**}$	$20,5 \pm 5,0$
TU 113	Glc3	tryp	2	$4,0 \pm 0,9$	$0,14 \pm 0,03^*$	$0,25 \pm 0,07$	$29,4 \pm 11,4^*$
TU 113	Glc3	pcs	2	$6,2 \pm 3,6^{***}$	$0,19 \pm 0,13^{**}$	$0,25 \pm 0,26^{**}$	$33,1 \pm 4,2$

TU 113 mit drei verschiedenen Ansätzen kultiviert. Zum einen in einem Medium mit Methionin (10 mM) ohne weitere Zusätze (Met10), zum anderen mit Methionin 10 mM und Glukose 3 % (Met10+Glc3) und drittens nur mit Glukose 3 % (Glc3). Wie aus Tab. 3.3 ersichtlich, steigert eine 24-stündige Inkubation der Zellen mit Methionin allein, Methionin plus Glukose oder nur Glukose bei alleinigem PCS-Lysieren die intrazelluläre SAM-Konzentration auf das 2-fache bzw. 3-fache gegenüber der Kontrolle (TU 113 Kontrolle, pcs: $2,3 \pm 0,2$ $nmol/10^7$ Zellen; TU 113 Met 10, pcs: $4,1 \pm 2,4$ $nmol/10^7$ Zellen; TU 113 Met10+Glc3, pcs: $4,9 \pm 4,1$ $nmol/10^7$ Zellen; TU 113 Glc3, pcs: $6,2 \pm 3,6$ $nmol/10^7$ Zellen). Weil dies auch zu einer signifikanten Steigerung der SAH- und Ado-Konzentration führt, hat es keine signifikante Veränderung des MPs zur Folge.

Werden die Zellen zuerst trypsinisiert, steigert die Inkubation mit Methionin die SAM-Konzentration nicht.

3.2.3 Inkubation der Zelllinien TU 113 und LN-229 mit Adenosin-2',3'-dialdehyd

Aus bereits durchgeführten Untersuchungen (Mattar 2006) ist bekannt, dass die Hemmung der SAH-Hydrolase durch Ado-2',3'-Dial zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der intrazellulären SAH-Konzentration führt. Da der größte Effekt bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 30 μ M beobachtet wurde,

Tabelle 3.4: Veränderung der SAM-, SAH- und Ado-Konzentrationen sowie des MPs durch Ado-2',3'-dial. Die Kultivierung der Zellen LN-229 und TU 113 mit Ado-2',3'-Dial 30 μ M erfolgte über einen Zeitraum von 24 h. Die Aufarbeitung erfolgte entweder durch Trypsinieren der Zellen mit anschließender Lyse oder durch direktes PCS-Lysieren. (s. Kap. 2.4.4 u. 2.4.5). Die Bestimmung der Metabolite erfolgte mittels HPLC, wie in Kapitel 2.4 beschrieben. Dargestellt sind $MW \pm SEM$ aus n unabhängigen Experimenten in $nmol/10^7$ Zellen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Zellreihe	Messung	tryp/pcs	N	SAM	SAH	Ado	MP
LN-229	Kontrolle	tryp	6	1,2 \pm 0,4	0,07 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02	17,3 \pm 2,3
LN-229	Kontrolle	pcs	6	1,1 \pm 0,3	0,03 \pm 0,02	0,026 \pm 0,01	40,9 \pm 12,8
LN-229	Ado-Dial	tryp	3	2,2 \pm 0,08	3,9 \pm 0,03	0,13 \pm 0,05	0,53 \pm 0,03
LN-229	Ado-Dial	pcs	3	2,9 \pm 0,7*	5,8 \pm 1,4***	0,03 \pm 0,06**	0,49 \pm 0,01***
TU 113	Kontrolle	tryp	6	2,6 \pm 0,4	0,19 \pm 0,04	0,26 \pm 0,05	14,1 \pm 3,0
TU 113	Kontrolle	pcs	6	2,3 \pm 0,2	0,1 \pm 0,03	0,19 \pm 0,05	25,0 \pm 5,8
TU 113	Ado-Dial	tryp	3	2,3 \pm 0,1*	3,9 \pm 0,3	0,13 \pm 0,05	0,58 \pm 0,03***
TU 113	Ado-Dial	pcs	3	2,6 \pm 0,1	5,6 \pm 0,3***	0,06 \pm 0,01*	0,47 \pm 0,02***

wurde diese Konzentration auch für diese Versuche eingesetzt. Bei dieser Hemmstoff-Konzentration ist der SAH-Gehalt der ausschließlich PCS-lysierten Zellen gegenüber Kontrollzellen 200-fach (LN-229 Kontrolle, pcs: $0,03 \pm 0,02$ nmol/ 10^7 Zellen; LN-229 Ado-Dial, pcs: $5,8 \pm 1,4$ nmol/ 10^7 Zellen) bzw. 50-fach (TU 113 Kontrolle, pcs: $0,1 \pm 0,03$ nmol/ 10^7 Zellen; TU 113 Ado-Dial, pcs: $5,6 \pm 0,3$ nmol/ 10^7 Zellen) erhöht, wie Tab. 3.4 entnommen werden kann. Da die SAH-Konzentration durch Hemmung der SAH-Hydrolase in viel stärkerem Maße ansteigt als die SAM-Konzentration, sinkt das MP gegenüber der Kontrolle. Bei den trypsinisierten Zellen lassen sich ähnliche Beobachtungen machen, die Konzentrationsunterschiede fallen aber geringer aus.

3.3. Bestimmung der Adeninnukleotide

Da die SAH-Hydrolase ein Bindeglied zwischen Transmethylierungs- und Energiestoffwechsel ist, stellt sich die Frage, inwiefern die zur Veränderung des MPs eingesetzten Substanzen den Energiestoffwechsel beeinflussen. Gleichzeitig wurde in diesen Versuchen auch der Einfluss der Aufarbeitungsmethode auf den Energiestoffwechsel untersucht. Ein Maß für den Energiezustand der Zelle ist die Energieladung (EC), die nach Atkinson und Walton (Atkinson and Walton 1967) berechnet wird. Die Formel zur Berechnung der EC-Werte findet sich in Kapitel 2.4.12.

Die Applikation von SAM, unabhängig von der Konzentration, hat keine signifikante Veränderung der ATP-, ADP- und AMP-Konzentration zur Folge, so dass auch die Energieladung gegenüber der Kontrolle unverändert bleibt (s. Tab. 3.5). Eine deutliche Veränderung der Energieladung bewirkt bei den Zellen der Linie LN-229 die Aufarbeitungsmethode. Die zeitintensivere Aufarbeitungsmethode mit trypsinisieren und anschließender PCS-Lyse der Zellen schlägt sich auch in der Vitalität der Zellen nieder. Der Einfluss von Ado-2',3'-Dial auf den Energiezustand der Zelllinie LN-229 zeigt, dass die intrazelluläre ATP-Konzentration von der eingesetzten Ado-2',3'-Dial-Konzentration unabhängig ist. Auch die ADP-Konzentration ist gegenüber der Kontrolle unverändert. Hingegen führt der Hemmstoff zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären AMP-Konzentration.

Tabelle 3.5 Einfluss der Aufarbeitungsmethoden und der Inkubation mit SAM auf die ATP-, ADP-, AMP-Konzentrationen und auf den EC-Wert (s. Kapitel 2.4.5). Die Zellen LN-229 wurden für 24 h mit SAM in steigenden Konzentrationen kultiviert. Die Aufarbeitung erfolgte entweder durch trypsinieren der Zellen mit anschließender Lyse oder durch direkte Lyse. (s. Kap. 2.4.4 u. 2.4.5). Die Bestimmung der Adeninnukleotide erfolgte mittels HPLC, wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben. Dargestellt sind $MW \pm SEM$ aus n unabhängigen Experimenten in $nmol/10^7$ Zellen. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Zelllinie	Messung	tryp/pcs	n	ATP	ADP	AMP	EC
LN-229	Kontrolle	tryp	6	$36,1 \pm 14,5$	$23,4 \pm 6,3$	$9,4 \pm 1,9$	$0,68 \pm 0,1$
LN-229	Kontrolle	pcs	6	$77,2 \pm 25,2$	$16,9 \pm 7,7$	$2,5 \pm 1,2$	$0,89 \pm 0,01$
LN-229	SAM 30	tryp	3	$46,5 \pm 19,3$	$29,2 \pm 8,2$	$15,6 \pm 2,2$	$0,66 \pm 0,1$
LN-229	SAM 30	pcs	3	$110,5 \pm 48,2$	$14,4 \pm 7,5$	$1,9 \pm 0,8$	$0,93 \pm 0,03$
LN-229	SAM 300	tryp	2	$36,9 \pm 2,4$	$22,2 \pm 0,15$	$12,7 \pm 2,3$	$0,67 \pm 0,1$
LN-229	SAM 300	pcs	3	$131,8 \pm 23,9$	$17,9 \pm 13,1$	$2,3 \pm 1,0$	$0,93 \pm 0,02$
LN-229	SAM 1mM	tryp	3	$46,9 \pm 19,5$	$23,6 \pm 3,9$	$13,5 \pm 4,2$	$0,69 \pm 0,08$
LN-229	SAM 1mM	pcs	4	$107,7 \pm 36,2$	$16,1 \pm 12,6$	$1,6 \pm 0,7$	$0,91 \pm 0,07^{**}$
LN-229	Ado-Dial	tryp	5	$37,7 \pm 7,3$	$22,2 \pm 4,8$	$6,0 \pm 1,7$	$0,74 \pm 0,02^*$
LN-229	Ado-Dial	pcs	6	$51,5 \pm 10,7^*$	$18,6 \pm 3,3^*$	$6,4 \pm 4,3^{**}$	$0,80 \pm 0,03^*$

Die Kultivierung der TU-113 Zellen mit Methionin bzw. Methionin plus Glukose oder nur Glukose hat keine signifikante Veränderung der ATP-, ADP- und AMP-Konzentration zur Folge, so dass auch die Energieladung gegenüber der Kontrolle unverändert bleibt. Im Unterschied zur Zelllinie LN-229 zeigt auch die Aufarbeitungsmethode bei dieser Zelllinie keinen Einfluss auf die Energieladung (s. Tab. 3.6). Die Inkubation von 30 μM Ado-2',3'-Dial führt zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären Adeninnukleotid-Konzentration. Der Energiezustand (EC) der Zelle ist gegenüber der Kontrolle jedoch nicht signifikant verändert.

Tabelle 3.6 Einfluss der Aufarbeitungsmethoden auf die ATP-, ADP-, AMP-Konzentrationen und auf den EC-Wert (s. Kapitel 2.4.5). Die Zellen TU 113 wurden für 24 h mit Methionin 10 mM, Methionin 10 mM + Glukose 3 % oder nur Glukose 3 % inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte entweder durch trypsinieren der Zellen mit anschließender Lyse oder durch direkte Lyse. (s. Kap. 2.4.4 u. 2.4.5). Die Bestimmung der Adeninnukleotide erfolgte mittels HPLC wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben. Dargestellt sind $MW \pm SEM$ aus n unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Zelllinie	Messung	tryp/pcs	n	ATP	ADP	AMP	EC
TU 113	Kontrolle	tryp	6	90,9±19,8	40,8±8,3	6,0±3,7	0,81±0,1
TU 113	Kontrolle	pcs	6	151,1±31,7	41,0±7,3	6,6±4,1	0,86±0,01
TU 113	Met10	tryp	3	100,4±33,1	42,0±19,3	12,1±12,8*	0,80±0,1
TU 113	Met10	pcs	3	172,8±57,5	37,9±30,7**	11,2±12,4*	0,88±0,1
TU 113	Met10+Glc3	tryp	2	70,1±0,4*	30,9±27,5*	3,2±3,3	0,84±0,1
TU 113	Met10+Glc3	pcs	2	121,3±37,3	39,0±44,4**	7,1±7,0	0,89±0,1*
TU 113	Glc3	tryp	2	112,6±8,5	45,9±39,0**	8,3±9,2	0,83±0,1
TU 113	Glc3	pcs	2	172,4±50,1	46,4±51,4**	6,7±5,9	0,89±0,1*
TU 113	Ado-Dial	tryp	3	70,4±1,6**	18,6±2,3	2,9±0,9	0,87±0,02
TU 113	Ado-Dial	pcs	3	96,2±4,4*	8,1±0,5**	2,4±0,1***	0,94±0,05*

3.4 Bestimmung der SAM-Konzentration im SAM-versetzten Medium

Aus der Literatur ist bekannt, dass die glykosidische Bindung des SAM im alkalischen Milieu äußerst labil ist (Schlenk and Zydek-Cwick 1969). Auch wurde beobachtet, dass SAM in einer Lösung bei pH 7.5 und einer Inkubationsdauer von 3 h bei 37 °C einen Verlust von 17 % erleidet (Hoffman 1986). Mit Hilfe einer qualitativen Untersuchung sollte geklärt werden, in welchem Ausmaß sich

Tabelle 3.7 Bestimmung der SAM-Konzentration in Medien mit SAM-Konzentrationen von 30 μ M-1 mM. Eine Probe wurde vor der 24-stündigen Inkubation entnommen, eine nach Inkubation von Medium ohne Zellen und eine dritte nach Inkubation mit LN-229 Zellen. Die Bestimmung von SAM erfolgte mittels HPLC, wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben. Dargestellt sind $MW \pm SEM$ aus n unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

SAM	n	30 μ M	300 μ M	1 mM
Kontrolle	4	26,0 \pm 3 μ M	238 \pm 12 μ M	817 \pm 62 μ M
Nach zellfreier Inkubation	4	10 \pm 3 μ M	51 \pm 6 μ M	179 \pm 20 μ M
Nach Inkubation mit Zellen	4	13 \pm 3 μ M	88 \pm 8 μ M	322 \pm 43 μ M

die SAM-Konzentration im Zellkulturmedium verändert. Für dieses Experiment wurde das Zellkulturmedium mit SAM in steigenden Konzentrationen versetzt. Als Kontrollwert wurde aus jedem Medium sofort eine Probe entnommen. Danach wurden Zellkulturschalen mit LN-229 Zellen und mit den jeweiligen Medien für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Auch Zellkulturschalen ohne Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Aus diesem Versuch lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen (s. Tab.3.7): Durch die experimentelle Bestimmung der Wiederfindungsrate für SAM im Zellkulturmedium lässt sich eine quantitative Aussage treffen, inwiefern das Messergebnis tatsächlich der Konzentration der Substanz vor Beginn der Inkubation entspricht. Die gemessenen SAM-Konzentrationen in den Kontrollmedien entsprechen im Rahmen der Messungenauigkeiten den eingesetzten Konzentrationen. Eine Inkubation der SAM angereicherten Medien mit Zellen führte nach 24-stündiger Inkubation zu höheren SAM-Werten als ohne Zellen, der Unterschied war aber nicht signifikant.

3.5 Methylthioadenosin

Aus den HPLC-Untersuchungen geht die charakteristische Reihenfolge hervor, in der die zu messenden Metaboliten von der Säule eluiert werden. Die Reten-

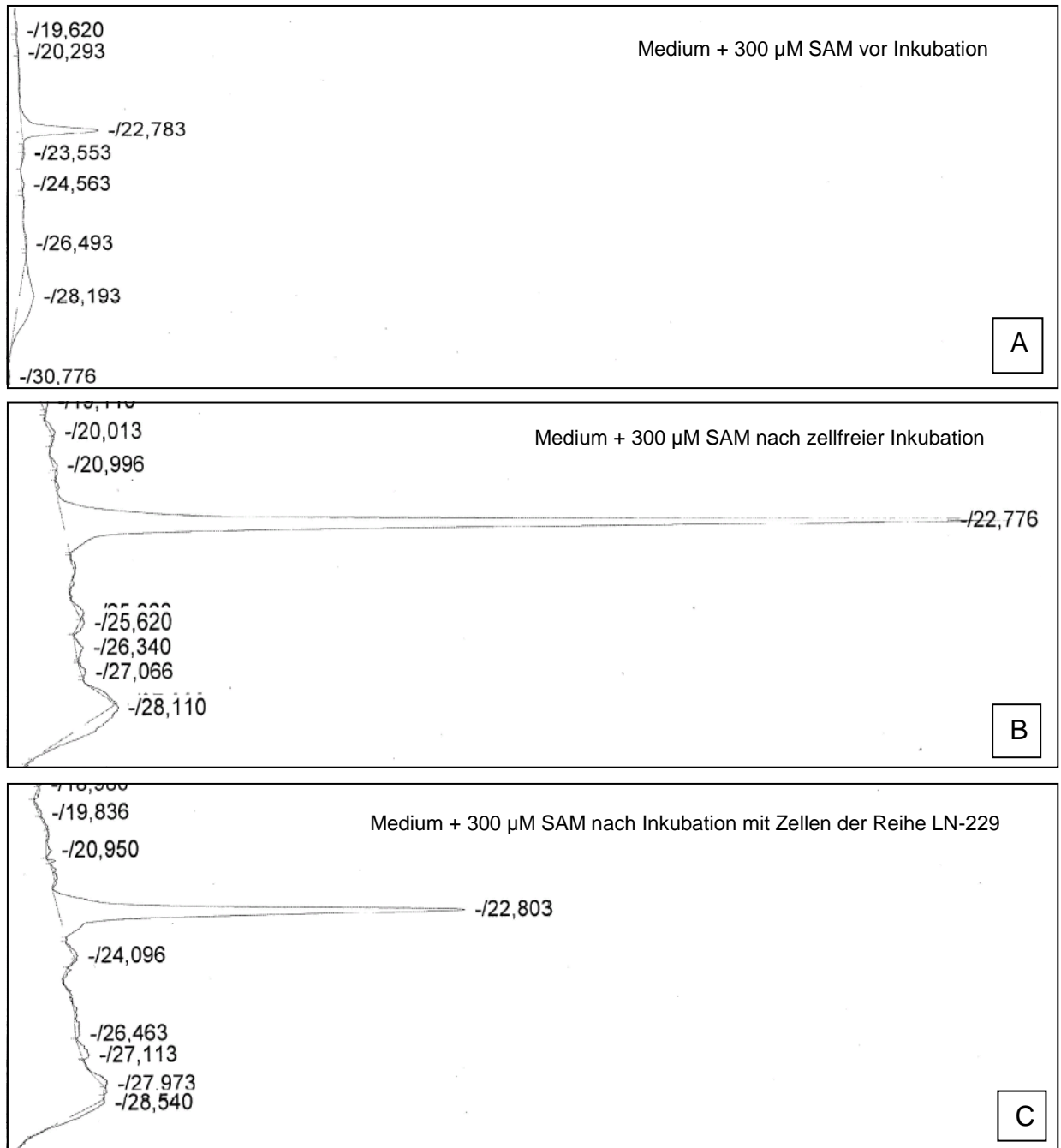


Abbildung 3.1: Ausschnitt aus dem HPLC-Chromatogramm. Dargestellt ist der Peak bei einer Retentionszeit von ca. 22,8 min, der dem Methylthioadenosin entspricht.

tionszeit steigt von SAH, Ado, SAM und Met-Ado hin an (Delabar et al. 1999). Bei allen Chromatogrammen aus den Versuchen mit SAM, trat bei einer Retentionszeit von 22 Minuten ein Peak auf. Um diese Substanz bestimmen zu können, wurde eine Probe bei 22 Minuten gesammelt und im Massenspektrometer analysiert. Die Substanz wurde als Methylthioadenosin (MTA) identifiziert, einem Spaltprodukt des SAM, das durch nichtenzymatische Reduktion entsteht. Das bei der Auswertung der Metaboliten SAH, SAM und Ado angewandte Protokoll ließ eine Quantifizierung des MTA-Peaks nicht zu. Aus Abb. 3.1 wird jedoch deutlich, dass nach 24 h zellfreier Inkubation (B) der Zerfall von SAM am größten ist.

3.6 Bestimmung der globalen DNA-Methylierung

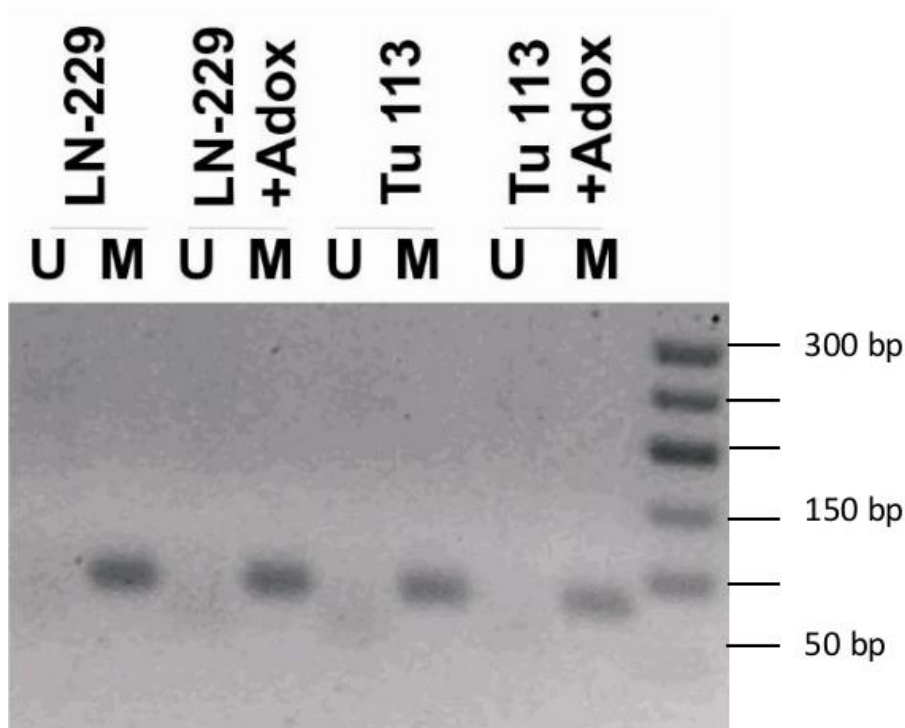
Nachdem eine signifikante Änderung des MPs nur unter Inkubation mit 30 μ M Ado-2',3'-Dial zu beobachten war, wurde der Grad der globalen DNA-Methylierung nur unter diesen Bedingungen untersucht. Das methylierungssensitive Restriktionsenzym HpaII schneidet nicht-methylierte Erkennungssequenzen. Dabei entsteht ein Guanosinüberhang, an dem die DNA-Polymerase ein [H^3]-dCTP einbaut. Somit ist die in die DNA eingebaute Radioaktivität ein Maß für die Anzahl nicht-methylierter Cytosinreste. Unter Kontrollbedingungen wurde nach Einbau von [H^3]-dCTP in die DNA die gleiche inkorporierte Radioaktivität sowohl in den LN-229 als auch in den TU 113 Zellen gemessen (s. Tab. 3.8).

Tabelle 3.8 Bedeutung eines veränderten MPs für die globale DNA-Methylierung in direkt PCS-lysierten LN-229 und TU 113 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Ado-2',3'-Dial 30 μ M (s. Kapitel 2.3.3). Die Ergebnisse sind in dpm/ μ g DNA \pm SEM angegeben aus n unabhängigen Experimenten angegeben.

Zellreihe	n	Kontrolle	+ Ado-2',3'-Dial (30 μ M)
LN-229	2	25593 \pm 7803	29645 \pm 12572
TU 113	2	25118 \pm 4628	29760,00 \pm 7510

Die Erniedrigung des MPs führt zu keiner signifikant veränderten globalen DNA-Methylierung innerhalb von 24 h.

Abbildung 3.2: Einfluss von Ado-2',3'-dial auf die MGMT-Promotormethylierung in Zellen der Linien LN-229 und Tu 113. Bisulfit behandelte DNA wurde für die PCR-Amplifikation eingesetzt. Die Größe des entstehenden PCR-Produkts wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Anwesenheit einer Bande in der Bahn U stellt den nicht-methylierten MGMT-Promotor dar während die Anwesenheit einer Bande in der Bahn M das methylierte Produkt darstellt. Die Länge der PCR-Produkte beträgt 94 bp für den nicht-methylierten Promotor und 81 bp für den methylierten Promotor.



3.7 MGMT-Promotormethylierung

DNA-Methylierung ist ein Effekt, der eine große Bedeutung bei der Regulation der Genaktivität besitzt. Eine aberrante DNA-Methylierung, speziell der Promotorbereiche, kann zum Verlust von wichtigen Genprodukten führen. Deshalb

wurde in diesem Experiment mit Hilfe der Bisulfit-Methode die dem 5'Ende nächstgelegene CpG-Insel des MGMT-Promotors untersucht.

Wie aus Abb. 3.2 hervorgeht zeigt sich der MGMT-Promotor sowohl bei den TU 113 als auch den LN-229 Zellen unter Kontrollbedingungen hypermethyliert. Die Erniedrigung des MPs durch Inkubation mit 30 μ M Ado-2',3'-Dial führte nicht zu einer Veränderung des elektrophoretischen Bandenmusters.

4. Diskussion

Glioblastome gehören zu den häufigsten Tumoren des Gehirns. Die Standardtherapie besteht seit 2005 aus chirurgischer Tumorverkleinerung, Bestrahlung und Chemotherapie mit der alkylierenden Substanz TMZ. Das gemittelte Gesamtüberleben nach Diagnosestellung verlängerte sich hierunter im Zeitraum 2005-2008 von 8,1 auf 9,7 Monate. Erhielten die Patienten als Therapie zumindest Operation und Bestrahlung stieg das Gesamtüberleben bereits auf durchschnittlich 12 bzw. 14,2 Monate. Seit Einführung des Temozolomid als Standardtherapie liegt das durchschnittliche Überleben altersabhängig zwischen 31,9 Monaten bei den 20-29 jährigen und 5,6 Monaten bei Patienten, die 80 Jahre und älter sind (Johnson and O'Neill 2012). So besteht ein besonderes Interesse die Therapie auch gerade für die Patientengruppe der älteren Menschen zu optimieren.

Für die Chemotherapie mit TMZ stellte sich der Methylierungsstatus des MGMT im Sinne einer Hypermethylierung als prognostisch günstiger Faktor für die Verlängerung Gesamtüberleben, bzw. des progressionsfreien Intervalls dar. Die Promotormethylierung als eine Art Sonderfall der Methylierung findet unter der Zuhilfenahme von DNA-Methyltransferasen am C'5 Atoms des Cytosin statt. (De La Haba and Cantoni 1959). In dieser Studie wurde an zwei Zelllinien der Einfluss verschiedener Substanzen auf das MP untersucht. Mittels einer sensitiven HPLC-Methode wurden gleichzeitig die Konzentrationen von SAM, SAH und Adenosin bestimmt und anschließend die Auswirkungen des veränderten MPs auf den Gesamtmethylierungsstatus der DNA allgemein und speziell auch auf den des MGMT-Promotors dargestellt.

Aufarbeitungsmethode: Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen eine Abhängigkeit des MP von der Aufarbeitungsmethode. Unter Kontrollbedingungen zeigen beide Zelllinien trypsiniert ein ähnliches MP, PCS-lysiert weisen die Zellen aber höhere MPs auf, die auch stärker differieren (LN-229 Kontrolle, pcs: $40,9 \pm 12,8$ nmol/ 10^7 Zellen vs. Kontrolle, tryp: $17,3 \pm 2,3$ nmol/ 10^7 Zellen; TU 113 Kontrolle, pcs: $25,0 \pm 5,8$ nmol/ 10^7 Zellen vs. Kontrolle, tryp: $14,1 \pm 3,0$ nmol/ 10^7

Zellen). Diese sind auf eine niedrigere SAH-Konzentration zurückzuführen. Ein Grund für die niedrigen SAH-Werte könnte eine hohe SAH-Hydrolase-Aktivität sein, die dafür sorgt, dass SAH nicht akkumuliert, sondern schnell weiter zu Adenosin und Homocystein hydrolysiert wird (De La Haba and Cantoni 1959), da unter physiologischen Bedingungen primär die Hydrolyse stattfindet. Unter normalen Bedingungen ist die SAH-Hydrolase für die intrazelluläre SAH-Konzentration verantwortlich (Hoffmann 1979; Perna et al. 2001). Ein anderer Mechanismus, die niedrige SAH-Konzentration im Zytosol zu erklären scheidet aus, da SAH die Plasmamembran nicht passieren kann. Auch sind keine SAH-Transporter bekannt (Kerins et al. 2001; Aarbakke and Ueland 1981). Eine zweite Fehlerquelle, die das MP beeinflussen kann sind postmortale Veränderungen von SAM- und SAH-Spiegel. Helland und Ueland (Helland and Ueland 1983) stellten in detaillierten Versuchen fest, dass nach konventioneller Verarbeitung von Organen postmortal SAH und Adenosin und in geringfügigerem Ausmaß auch SAM anstiegen. Diese Zunahme konnte durch das Eintauchen eines entnommenen Gewebeteiles in flüssigen Stickstoff verringert werden. Von größter Bedeutung für die Objektivität der Untersuchung erwies sich die Gefrierstopp-Technik nach (Osswald et al. 1977). Durch das rasche Durchfrieren des Gewebes hat man eine Momentaufnahme des Gewebezustandes. Das Aufarbeiten in Perchlorsäure führt dann dazu, dass die enzymatischen Reaktionen gestoppt werden, so dass die gemessenen Nukleosidwerte physiologischen Konzentrationen entsprechen. Zellen können der Gefrierstopptechnik nicht unterworfen werden, hier führt die alleinige PCR-Lysierung aber zu ähnlich physiologischen Werten. Vor diesem Hintergrund lässt sich beobachten, dass bereits die Verzögerung des PCS-Lysierens durch das initiale Trypsinieren oder aber das Trypsin selbst sich auf die Messergebnisse auswirken. Aus diesem Grund wurden letztlich für die Auswertung der Versuche zur Beeinflussung des Methylierungspotenzials nur die Ergebnisse der direkt PCS-lysierten Zellen berücksichtigt.

Methylierungspotenzial: Der Quotient der SAM- und SAH-Konzentration wird als Methylierungspotenzial (MP) bezeichnet und ist ein wichtiger Indikator für

die Übertragung von Methylgruppen von SAM auf einen Akzeptor (Cantoni et al. 1979). Im direkten Vergleich der beiden Glioblastomzelllinien zeigten die Zellen TU 113 unter Kontrollbedingungen eine annähernd doppelt so hohe SAM-Konzentration wie die Zellen der Line LN-229, allerdings waren hierbei das SAH fast 3-fach und der Adenosinspiegel fast 6-fach erhöht, die Folge hiervon ist ein deutlich niedrigeres MP (LN-229: $40,9 \pm 12,8$; TU 113: $25,0 \pm 5,8$). Die Werte des MP passen zu den in Untersuchungen an anderen Zelllinien gefundenen Werten. Unter normaler physiologischer Zellfunktion liegt das MP zwischen 5 und 80, abhängig von den untersuchten Zelllinien oder Organen (Hermes et al. 2005). Die relativ große Breite der MP-Werte der gewählten Glioblastomzelllinien bieten gute Bedingungen zur Beobachtungen von Auswirkung unterschiedlicher MPs auf die DNA-Methylierung. Eine Erhöhung des MPs der Zelllinie LN-229 nach Inkubation mit SAM stellte sich nicht ein, mit steigender SAM-Konzentration fiel das MP ab. Zwar stiegen die SAM-Werte auf das bis zu 5-fache, aber auch SAH und Adenosin erreichten das 6- bzw. das 3-fache des Kontrollwertes. Es wird also deutlich, dass das MP und die Methylierungsaktivität der Zelle von mehreren Faktoren kontrolliert wird.

Bei den Versuchen zur Beeinflussung des MP mit der Zelllinie LN-229 stellt sich grundsätzlich die Frage, ob SAM überhaupt in die Zelle aufgenommen wird. In *Aeromonas hydrophila* wurde ein protonenabhängiger Antiport von SAM und SAH nachgewiesen, der in der Lage ist einen sonst fehlenden Methylierungszyklus zu ersetzen (Haferkamp et al. 2013). Van Phi und Soling (Van Phi and Soling 1982) untersuchten die SAM Aufnahme an isolierten Hepatozyten. Die Zellen wurden mit radioaktiv markierten SAM bzw. Methionin inkubiert und später durch Zentrifugieren sukzessiv fragmentiert und anschließend die Inkorporation der radioaktiven Methylgruppen in den fraktionierten Zellbestandteilen gemessen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Methylgruppen des Methionins intrazellulär auf RNA übertragen wurden, während die Methylgruppen des SAM nur an der Zellmembran und hier vor allem im Phosphatidylcholin nachweisbar blieben. Bontemps und Van den Berghe (Bontemps and Van Den Berghe 1997) führten ihre Versuche zum

Thema ebenso mit radioaktivem SAM bzw. Methionin durch, auch sie verorteten die Methylgruppen des SAM im Phosphatidylcholin der Zellmembran. In einem Teilversuch steigerten sie zwar die zelluläre Radioaktivität unter Inkubation mit SAM, aber unter Hemmung der SAH-Hydrolase stieg der intrazelluläre SAH-Spiegel nicht, was unter Inkubation mit Methionin aber der Fall war, wodurch sie untermauert sahen, dass SAM nur in die Membran verbleibt. In einem anderen Experiment beobachteten sie, dass SAM in reinem Medium über 60 min keinem Zerfall unterlag. Im Medium mit Zellen aber Methylierungsprozesse stattfinden müssen, da hier neben sinkendem SAM auch steigende SAH-Konzentrationen auffielen. Sie begründeten dies damit, dass Methyltransferasen aus lysierten Zellen ins Medium abgegeben würden und hierdurch überhaupt Transmethylierungen stattfinden könnten. Um diese Theorie zu untermauern wurden Zellen durch Einfrieren und anschließendes Wiederauftauen lysiert, in der Folge stieg die Verstoffwechselung von SAM auf das bis zu 7-fache an. In einer weiteren Untersuchung fand Mac Millan – ebenfalls an Hepatozyten eine geringe, nicht konzentrationsabhängige Aufnahme in einem Zell/Medium Konzentrationsverhältnis von 0,2-0,5 und schloss auf eine nicht transporterabhängige Aufnahme in die Zelle, die sehr ineffektiv ausfällt (McMillan et al. 2005). Intrazellulär wurde bereits ein SAM-Carrier beschrieben, beim Menschen sorgt ein solcher für einen Austausch von SAM und SAH zwischen Zytosol und Mitochondrium (Agrimi et al. 2004; Ravanel et al. 2004). Ein weiterer Gesichtspunkt zu der Frage, ob SAM in die Zelle aufgenommen wird, ist die Entstehung von Methylthioadenosin. Wenn SAM nicht durch Transmethylierungsprozesse verbraucht wird, kann es spontan zu Methylthioadenosin zerfallen. Als solches stellte sich ein mit der SAM-Konzentration im Medium der Zellen LN-229 zunehmender, in diesem HPLC-Protokoll nicht quantifizierter flächenmäßig sehr großer Peak bei einer Retentionszeit von 22,8 min heraus. Die Substanz wurde über eine massenspektroskopische Analyse identifiziert. MTA ist das primäre Zerfallsprodukt von SAM, seine Entstehung ist pH-Abhängig (Hoffman 1986), ein in den basischen Bereich ansteigender pH führt zu einer Erhöhung des Abbaus (Borchardt et al. 1979). Bei pH 1,5 findet ein Zerfall des SAM nicht mehr

statt, lediglich das Razemat der Substanz konnte beobachtet werden (J. L. Hoffmann, 1986). Dagegen wird die kovalente Stabilität des SAM durch Senkung des pH erheblich verbessert. So liegt eine Erklärungsmöglichkeit für die vermehrte Entstehung von MTA in dem unter der Inkubation vorherrschenden pH, da dieser im unveränderten Medium im alkalischen Bereich liegt, außerdem zerfällt SAM bei der vorherrschenden Temperatur von 37 °C leicht (J. L. Hoffman, 1986).

Untermauern lässt sich diese Vermutung durch die Messungen der SAM-Konzentration im zellfreien Medium. Nach 24 h Inkubation von 300 µM SAM bei 37 °C verringerte sich die Menge des gelösten SAM um 2/3 der Ausgangskonzentration. Für die Messung der zellulären SAM-Konzentration mussten die Proben vor der HPLC außerdem zusätzlich alkalisiert werden, was die Entstehung von MTA ebenfalls begünstigt. Unter keiner experimentellen Bedingung führte der Zerfall von SAM zur Entstehung von Adenosin oder SAH (Eloranta and Kajander 1984).

Zusammenfassend lassen sich aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen keine eindeutigen Rückschlüsse bezüglich der SAM-Aufnahme in die Zelle ziehen, jedoch weisen die Daten darauf hin, dass MTA in die Zelle aufgenommen werden kann. Neuere Untersuchungen zeigen, dass bei oraler Einnahme von MTA diese Substanz zügig im Gastrointestinaltrakt absorbiert wird.

Die Zufuhr neuer Methylgruppen in den Zyklus der aktivierten Methylgruppen erfolgte bei den Zellen der Linie TU 113 in Form von Methionin. Methionin gehört für den Menschen zu den essentiellen Aminosäuren, deren Konzentration von der Nahrungsaufnahme beeinflusst wird. Es kann in die Zelle aufgenommen werden und zusammen mit Glukose, die durch oxidative Phosphorylierung zu ATP wird, sind die Voraussetzungen gegeben, um SAM in der Zelle ansteigen zu lassen. Die experimentelle Gabe von Methionin führt im Meerschweinchen zu einem Anstieg von SAM bei gleichzeitiger Verminderung des ATP (Cox et al. 1974; Lescault and Laberge 1974), da ATP zur Aktivierung des Methionins benötigt wird.

In den durchgeführten Experimenten wurden die Zellen mit Glukose 3 %, Methionin 10 mM und mit der Kombination aus beidem inkubiert. Unter diesen Bedingungen stieg die SAM-Konzentration auch an, das MP blieb aber unverändert, da auch die SAH-Spiegel gestiegen waren. Das vermehrt SAH entsteht, liegt vermutlich an einer gesteigerten Methylierungsaktivität in den Zellen, denn SAM wird nach Transfer einer Methylgruppe im aktiven Zentrum der Methyltransferase zu SAH abgebaut (Cantoni 1975). Da SAH seinerseits als Produktinhibitor der meisten Methyltransferasen fungiert (Clarke and Banfield 2001) ist für einen ungestörten Ablauf der Transmethylierungsreaktionen eine Entfernung von SAH durch die SAH-Hydrolase von essentieller Bedeutung. Deshalb kann durch Hemmung der SAH-Hydrolase das MP wirkungsvoll gesenkt werden und somit in Transmethylierungsreaktionen eingegriffen werden.

In der Literatur sind viele Untersuchungen über die Auswirkungen eines verringerten MP auf Methylierungsreaktionen beschrieben (Radomski et al. 1999; Hermes et al. 2004; Hermes 2004b). Unter experimentellen Bedingungen treten nennenswerte Beeinträchtigungen der Methyltransferasen erst ab Quotienten auf, die unterhalb von 5 liegen (Hoffman et al. 1981; Kramer et al. 1990; Clarke and Banfield 2001). Ein wirkungsvolles Instrument das MP zu senken, ist der Einsatz der oxidierten Form von Adenosin, Adeonodin-2'.3'-Dialdehyd (Ado-2',3'-Dial). Ado-2',3'-Dial ist kein Substrat der SAH-Hydrolase, aber ein sehr potenter irreversibler Hemmstoff dieses Enzyms. So konnten Bartel und Borchardt (Bartel and Borchardt 1984) die Aktivität der SAH um 95 % senken, was zu partiell verminderter Lipidmethylierung, Proteincarboxylierung und RNA-Methylierung führte. Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die Methylierung der gesamten mRNA reduziert war, jedoch keinen Effekt auf die DNA-Methylierung existierte (Kallio et al. 1997; Araujo et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie an HepG2 Zellen von Hermes et al. (Hermes et al. 2004). Die Verringerung des MP um das 40-fache führte zur Reduktion der mRNA ausgewählter Gene, wie z. B. Erythropoetin, während die mRNA von Haushaltsgenen, wie z. B. der SAH-Hydrolase oder Cyclophilin, von diesem MP unbeeinflusst blieben. In

menschlichen Lymphozyten führten dagegen bereits 2-fach erhöhte SAH-Werte zu DNA Hypomethylierung, und auch in Geweben von Mäusen, die für die Cystathionin - β -Synthase heterozygot sind, konnte bei verringertem MP globale DNA-Hypomethylierung festgestellt werden (Yi et al. 2000; Caudill et al. 2001). Insgesamt fand Caudill MP abhängige Verringerung von Methylierungsreaktionen nicht generell von gesenkten MPs, sondern vor allem von steigenden SAH-Spiegeln abhängig (Caudill et al. 2001).

In dieser Untersuchung wurden die MPs durch die Inkubation der Zelllinien LN-229 und TU 113 mit 30 μ M Ado-2',3'-Dial gesenkt. In den PCS-lysierten Zellen konnte so das MP um das 80-fache bzw. 50-fache gesenkt werden. Damit waren Voraussetzungen geschaffen, um den Einfluss eines reduzierten MP bei erhöhten SAH-Spiegeln auf den Methylierungsgrad des MGMT-Promotors zu bestimmen.

Bestimmung der Adeninnukleotide und der Energieladung: Nahezu alle energieverbrauchenden Prozesse in Zellen werden entweder direkt oder indirekt durch die Hydrolyse von ATP zu ADP oder zu AMP angetrieben (Yang and Gupta 2003). Die SAH-Hydrolase stellt ein Bindeglied zwischen Transmethylierungs- und Energiestoffwechsel da (Kloor et al. 1996). In den durchgeführten Versuchen wurden mittels HPLC auch die Konzentrationen der Adeninnukleotide bestimmt, um Wechselwirkungen zwischen Transmethylierungsreaktionen und Energiehaushalt zu beobachten. Auffällig ist hier, dass das Verhältnis der Adeninnukleotide abhängig von der Art der Aufbereitung und vom Zelltyp deutlich schwankte. Wurden die Zellen nur PCS-lysiert war die ATP-Konzentration zum Teil bis auf das Doppelte erhöht. Unter normalen physiologischen Bedingungen hat ATP in Abhängigkeit vom Gewebe einen 5- bis 10-mal höheren Spiegel als ADP und einem 20- bis 50-fach höheren als AMP (Yang & Gupta, 2003), wobei die Gesamtkonzentration der Adeninnukleotide normalerweise relativ konstant bleibt. Vielen Enzymen wird durch Spaltung von ATP direkt oder indirekt die notwendige Energie zur Verfügung gestellt, so kann eine ausreichende Menge zur Verfügung stehenden ATPs als eine Art Schlüsselbedingung für den Erhalt der zellulären Integrität betrachtet werden. Yang und Gupta

(Yang and Gupta 2003) untersuchten – ebenfalls an Glioblastomzellen – die Auswirkung von Trypsinieren und anschließend PCS-lysieren versus alleinigen PCS-lysieren auf die Zelle und fanden einen Abfall der Gesamtkonzentration der Adeninnukleotide auf weniger als die Hälfte und einen Abfall der EC von 0,78 auf 0,50. Bei den hier untersuchten Zellen der Linie LN-229 zeigten sich nach ausschließlichem PCS-lysieren unter Kontrollbedingungen ein EC-Werte 0,89 und nach vorhergehendem Trypsinieren von 0,68. Gesunde, ausreichend oxygenierte Zellen regulieren die EC normalerweise in einem Bereich zwischen 0,7-1,0 (Gupta et al. 1994; Gupta et al. 2001b; Gupta et al. 2000; Gupta et al. 2001a; Gupta et al. 2002; Gupta and Dettbarn 1987; Sellevold et al. 1986). Ausgeprägter war das Abfallen des ATP-Spiegels – nach ausschließlichem PCS-lysieren lag dieser bei den Kontrollen der Zelllinie LN-229 bei $77,2 \pm 25,2$ nmol/ 10^7 Zellen (LN-229 Kontrolle, pcs), trypsiniert bei $36,1 \pm 14,5$ nmol/ 10^7 Zellen (LN-229 Kontrolle, tryp).

Die Zellen der Linie TU 113 boten im Vergleich zwischen trypsinierten und nur PCS-lysierten Zellen durchweg unveränderte EC-Werte, so scheinen sie zunächst bezüglich der Aufarbeitungsart und ihrer Auswirkungen auf die EC weniger empfindlich zu sein. Bei Betrachtung des ATP-Spiegels zeigt sich aber auch hier ein Abfall: Unter Kontrollbedingungen lag dieser nach ausschließlichem PCS-lysieren bei $151,1 \pm 31,7$ nmol/ 10^7 Zellen und fiel bei zusätzlichem Trypsinieren auf einen Wert von $90,9 \pm 19,8$ nmol/ 10^7 Zellen ab.

Unter Inkubation mit Ado-2'3'-Dial veränderten sich die EC-Werte nicht, somit scheint die Substanz die Zellen nicht zu schädigen. Die ATP-Werte aber sanken mit Ausnahme der trypsinierten Zellen der Linie LN-229 ab.

Abbau von S-Adenosylmethionin im Nährmedium der Zelle: Die Wiederfindungsrate von SAM im SAM-versetzten Medium zeigte nach Inkubation mit Zellen höhere SAM-Werte als nach Inkubation ohne Zellen. Bontemps und Van der Berghe (Bontemps and Van Den Berghe 1997) beobachteten in Ihren Studien, dass im Kulturmedium mit Zellen Transmethylierungsprozesse stattfinden, sie konnten zeigen, dass dies auf Methyltransferasen zurückzuführen ist, die von

zerfallenen Zellen freigesetzt wurden. Analog lassen sich erhöhte SAM-Spiegel in mit Zellen inkubiertem Medium durch Freisetzung aus lysierten Zellen erklären.

Globale DNA-Methylierung: Die Erhöhung der intrazellulären SAH-Konzentration durch Hemmung der SAH-Hydrolase in LN-229 und TU-113 über einen Zeitraum von 24 h führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der globalen Methylierung gegenüber Kontrollzellen. Diese Beobachtung ist nicht verwunderlich, da die Methylierung der DNA gleichzeitig mit der Replikation während der S-Phase des Zellzyklus stattfindet (Araujo et al. 1999; Araujo et al. 1998). So konnte Liteplo (Liteplo 1988) in *in vitro* Untersuchungen an murinen und humanen Tumorzellen ebenfalls eine geringe Sensitivität der DNA-Methylierung gegenüber Veränderungen des MP zeigen. Auch eine Dauerinkubation der Zellen mit dem SAH-Hydrolase Hemmstoff Ado-2',3'-Dial über 7 Wochen, wie sie Hermes et al. (2004) durchgeführt hat, zeigte keine Auswirkung auf die globale DNA-Methylierung.

MGMT-Promotor-Methylierung: Der MGMT-Status von Gliomzellen war in den letzten Jahren häufig Gegenstand von Diskussionen. Nachdem sich mehrere Untersuchungen mit dem Thema befasst haben, zeigte sich letztlich, dass der Methylierungsstatus des MGMT-Promotor bei bösartigen Gliomen nachweislich einen prädiktiven Wert für das Ansprechen auf Alkylantien hat und nicht einfach ein prognostischer Marker ist. Andererseits konnte bei anaplastischen Gliomen nachgewiesen werden, dass sich progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben bei methyliertem MGMT-Promotor auch dann verlängern, wenn keine Chemotherapie, sondern nur Bestrahlung erfolgt (Wick et al. 2009). In einer Folgeuntersuchung zeigte sich die Bedeutung des Mutationsstatus des Gens für die Isozitat Dehydrogenase 1 (IDH1) (Wick et al. 2012a). Liegt in diesem Gen eine Mutation vor, ist dies ein therapieunabhängiger günstiger prognostischer Faktor. Weist der Tumor aber einen IDH1 Wildtyp auf, ist der methylierte MGMT-Promotor prädiktativ für ein verlängertes progressions-

freies Überleben unter Behandlung mit TMZ. Solche Patienten sollen nicht ausschließlich mit Radiotherapie behandelt werden.

Problematisch bleibt die Feststellung des Methylierungsstatus des MGMT-Promotors. Die aktuell einzige validierte Technik, die eine gesicherte prognostische Aussage über den MGMT Promotor erlaubt, bleibt momentan die methylierungsspezifische PCR (Weller et al. 2010). Außerdem stellt sich die Frage, wie man die Erhebung des MGMT-Promotormethylierungsstatus am besten standardisiert (Weller 2013). Die MGMT Expression variiert zwischen verschiedenen Organen, in der Praxis zeigte sich zudem das Problem der Kontamination. Proben enthalten teilweise nicht tumoröse Bereiche oder aber Bereiche mit Hypervaskularisation oder aber Lymphozyteninfiltrate, die in den Untersuchungen erfasst werden und zu falschen Resultaten führen.

Ein anderes Problem sind verschiedene Messmethoden für die DNA-Methylierung, die teils rein qualitativ, teils auch quantitativ sind. Es stellt sich die Frage nach der Bewertung der Befunde, ab wann genau ist ein MGMT-Promotor hyper- oder hypomethyliert? Diagnostische methylierungsspezifische Tests zielen darauf ab durch den Nachweis einer Methylierung bestimmter Bereiche des Promotors das Methylierungsverhältnis des gesamten Promotors vorherzusagen. Für die Bestimmung des Methylierungsstatus nutzen die meisten Tests die Behandlung mit Bisulfit. Die Bisulfitkonversion ist ein hochkritischer Schritt, da eine unvollständige Konversion zu vermeintlich methylierten CpG-Inseln führt. Bisulfitbehandelte DNA ist instabil und sollte zügig der Messung unterzogen werden. Bei den qualitativen MSPs, die am häufigsten verwendet werden, lässt sich in der anschließenden Gelelektrophorese nur erkennen, ob die Bandenmuster einem nicht methylierten oder methylierten MGMT-Promotor entsprechen, die Primer sind so gewählt, dass sie an einem komplett methylierten oder komplett unmethylierten Sequenzen binden können und fragen in der Regel eine Reihe von 3-5 CpGs ab (Herman et al. 1996; Esteller et al. 1999; Weller et al. 2010). Die in dieser Untersuchung angewendete Bisulfitsequenzierung ohne anschließende RT-PCR hat sich mittlerweile als wenig sensitiv herausgestellt, für den Nachweis von Methylierung müssen mindestens 25 % des entsprechenden Abschnittes methyliert

sein. Das könnte ein Grund sein, warum der Promoter der beiden Zelllinie LN-229 und TU-113 auch nach 24 h Behandlung mit dem SAH-Hydrolase Inhibitor Ado-2',3'-Dial keine Veränderung in ihrem Methylierungsmuster zeigten und hypermethyliert blieben. Hier lässt sich folglich auch kein Einfluss des MP auf den Methylierungsstatus des MGMT-Promoters nachweisen.

Bei quantitativen Verfahren müssen Cut-off Werte definiert werden, die anschließend eine prospektive Kontrolle erfordern. In manchen Untersuchungen zeigten sich Subgruppen von Patienten, die technisch einen intermediären Methylierungsstatus aufwiesen, teilweise dürften solche Patienten in ein Kollektiv mit formal methylierten MGMT-Promotor fallen, die trotz allem nicht von einer Chemotherapie mit TMZ profitieren (Weller et al. 2010). Die Erfassung des Methylierungsstatus kann auch durch Pathologen vorgenommen werden. Insgesamt kommt es aber bereits in der histologischen Beurteilung des Gewebes ohne immunhistochemische Expressionsanalysen zu Abweichung der Befundung. Von 585 histologischen Proben, die in EORTC-Studien vom lokal ansässigen Pathologen unter Gliomen des WHO Grad II verbucht wurden, erfolgte in 390 Fälle die erneute Erhebung des Befundes in einem entsprechenden pathologischen Zentrum. Hiervon wurde die Diagnose 308 mal bestätigt (79 %), bei 65 Patienten (16,7 %) lag aber ein hochgradiges Gliom (WHO Grad III-IV) vor, bei 6 Patienten (1,5 %) eines vom Grad 1 und in 11 weiteren Fällen zeigten sich gänzlich andere Pathologien (Gorlia et al. 2013). Im Bereich der immunhistologischen Evaluation bestehen ähnliche Probleme. Die Befunde weichen abhängig vom befundenen Pathologen sowohl interindividuell, als auch intraindividuell stärker ab, so dass aus der Beurteilung der MGMT-Promotor Genexpression anhand histologischer Färbung kein prognostischer Zusammenhang abgeleitet werden konnte (Preusser et al. 2008). So wird die Bewertung pathologischer Befunde bezüglich ihrer Verlässlichkeit und zu ziehender Therapiekonsequenzen diskutiert. Zu dieser Thematik wurde von Lalezari (Lalezari et al. 2013) eine Arbeit vorgestellt, in der die immunhistologische Evaluation von Glioblastompräparaten in einer Konvention verwendet wurde, die auch eine hohe intra- und in-

terpersonale Reproduzierbarkeit aufwiesen, hierbei wurde die Schwelle für MGMT-Expression bei 30 % gezogen. Gleichzeitig erfolgte die Evaluation des MGMT-Promotormethylierungsstatus mit MSP und BiSEQ. Anschließend wurden retrospektiv das progressionsfreie Intervall und das Gesamtüberleben Betrachtet. Die Übereinstimmung zwischen so ermittelter MGMT-Expression und MGMT-Promotorstatus war hoch. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit hoher Proteinexpression einen schlechten Krankheitsverlauf aufweisen, trotz Methylierung des MGMT-Promotors, während Patienten mit geringer Proteinexpression aber nicht methylierten Promotor auch eine schlechte Prognose aufweisen (Lalezari et al. 2013). Hier stellt sich die immunhistologische Komponente als unabhängiger prädiktiver Faktor da. Wie diese Ergebnisse letztlich zu bewerten sind, sprich welche diagnostischen Verfahren zur Abschätzung der Prognose und für die Entscheidung für eine Therapie essentiell sind, bleibt noch offen. Für die standardisierte Bestimmung des Methylierungsstatus des MGMT-Promotors hat sich auf jeden Fall noch kein Prozedere endgültig durchgesetzt und die weiteren Entwicklungen bleiben abzuwarten.

Letztlich stellt sich die Frage nach der Relevanz des MGMT-Promotors bezüglich der Therapieentscheidungen. Vor allem in der Gruppierung der älteren Patienten (in den betrachteten Studien zumeist über 65-70 Jahre alt), die eine noch schlechtere Prognose aufweisen, als jüngere (4-6 Monate Gesamtüberleben vs. 12-15 Monate (Yin et al. 2013; Hartmann et al. 2010), zeichnet sich eine größere Bedeutung ab. Therapeutisch wird in dieser Patientengruppe mit Blick auf den oftmals schlechteren Allgemeinzustand des Patienten auf aggressive Therapie verzichtet. Die Erwartung besteht, dass unter schlechten Vorbedingungen, aggressive Therapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie eventuell mehr Schaden als nutzen, hier auch vor dem Hintergrund, dass diese beim älteren Menschen ein noch ungünstigeres Nebenwirkungspotenzial aufweisen als beim Jüngeren – bezüglich älteren Brustkrebspatientinnen zeigte sich, dass obwohl viele Patienten formal untertherapiert waren, sich das Gesamtüberleben nicht unterschied (Rocco et al.

2013; Sahebjam et al. 2012). Umgekehrt konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass älteren Menschen mit methyliertem MGMT-Promotor unter Chemotherapie eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls aufweisen, bzw. sogar ein leicht verlängertes Gesamtüberleben (Yin et al. 2013; Wick et al. 2012a), so erscheint eine grundsätzliche Therapiezurückhaltung beim älteren Glioblastompatienten nicht gerechtfertigt. Abzuwägen sind hierbei auch die Nebenwirkungen der Chemotherapie, die zumeist hämatologische sind (Neutropenie, Lymphozytopenie, Thrombopenie), sich aber auch in erhöhten Transaminasen, Infektionen oder thrombembolischen Ereignissen äußern können (Wick et al. 2012b). In einer Metaanalyse zeigten ältere Menschen ein Auftreten von hämatologischen Nebenwirkungen unter Therapie mit TMZ in 17 % der Fälle, was der Inzidenz bei jüngeren Patienten entspricht. Ältere, die einen nicht methylierten MGMT-Promotor aufwiesen, zeigten in einer Untersuchung von Wick unter Therapie mit TMZ sogar eine Verkürzung des Gesamtüberlebens (3.3 vs. 4,6 Monate (Wick et al. 2012b)).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass man im Kollektiv der älteren Menschen mit dem Methylierungsstatus des MGMT-Promotors, Patienten identifizieren kann, die von einer Chemotherapie profitieren oder – im Falle eines Patienten in schlechtem Vorzustand, mit nicht-methylierten MGMT-Promotor – bei denen man in Anbetracht der Prognose und der unter den zu erwartenden Nebenwirkungen einer Chemotherapie, von einem solchen Therapieversuch grundsätzlich absieht. Hier hätte also der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors eine wirkliche therapiebeeinflussende Relevanz.

Zusammenfassung

Die Glioblastomzellen der Linie LN-229 und TU 113 weisen unter Kontrollbedingungen unterschiedliche Methylierungspotenziale auf. Initiales Trypsinieren und anschließendes PCS-Lysieren von Zellen wirkt sich zelltypabhängig unterschiedlich stark auf die Konzentrationen von SAM, SAH und Ado aus, erscheint aber nicht ideal um diese Metabolite zu bestimmen. Für solche Messungen sollten Zellen stattdessen ausschließlich PCS-lysiert werden. Nach dem Trypsinieren kommt es bisweilen zu einem Anstieg der SAH und Ado-Konzentrationen, wie sie auch nach dem Absterben von Gewebe beschrieben wurden. Werden Zellen Trypsiniert und anschließend PCS-lysiert hat dies auch Auswirkung auf den Stoffwechsel der Adeninnukleotide, zwar bleibt die EC auch hier zelltypabhängig z. T. unverändert, aber man verzeichnet einen deutlichen Anstieg von AMP zu Lasten von ATP. Auch hier erzielt man bessere Ergebnisse, wenn man die Zellen nur PCS-lysiert. Die Inkubation mit SAM, respektive mit Methionin und/oder Glukose vermag das MP nicht zu verändern. Künstlich gesteigerte SAM-Konzentrationen, scheinen mit erhöhten SAH- und Ado-Spiegeln assoziiert. Die Inkubation mit SAM führt zur Bildung von Methylthioadenosin, das im Gegensatz zu SAM in die Zelle aufgenommen werden kann. Während der Inkubation von Zellen werden von zerfallenen Zellen Stoffwechselprodukte ins Medium abgegeben. Diese können die Messergebnisse beeinflussen. Der SAH-Hydrolase Hemmstoff Ado-2'3'-Dial senkt das MP in den hier durchgeführten Versuchen deutlich auf Werte von 0,5 ab. Dieses erniedrigte MP hat jedoch keinen Einfluss, weder auf den globalen Methylierungsstatus der DNA noch den des MGMT-Promotors, Grundsätzlich stellt sich hier die Frage, ob Zellkulturen ein geeignetes Modellobjekt sind, bzw. welche Messtechnik sich zur Bewertung des MGMT-Promotors eignet.

Literaturverzeichnis

- AARBAKKE, J. & UELAND, P. M. 1981. Interaction of S-adenosylhomocysteine with isolated rat hepatocytes. *Mol Pharmacol*, 19, 463-9.
- AGRIMI, G., DI NOIA, M. A., MAROBBIO, C. M., FIERMONTE, G., LASORSA, F. M. & PALMIERI, F. 2004. Identification of the human mitochondrial S-adenosylmethionine transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution. *Biochem J*, 379, 183-90.
- ARANDA, P., AGIRRE, X., BALLESTAR, E., ANDREU, E. J., ROMAN-GOMEZ, J., PRIETO, I., MARTIN-SUBERO, J. I., CIGUDOSA, J. C., SIEBERT, R., ESTELLER, M. & PROSPER, F. 2009. Epigenetic signatures associated with different levels of differentiation potential in human stem cells. *PLoS One*, 4, e7809.
- ARAUJO, F. D., KNOX, J. D., RAMCHANDANI, S., PELLETIER, R., BIGEY, P., PRICE, G., SZYF, M. & ZANNIS-HADJOPOULOS, M. 1999. Identification of initiation sites for DNA replication in the human dnmt1 (DNA-methyltransferase) locus. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 9335-9341.
- ARAUJO, F. D., KNOX, J. D., SZYF, M., PRICE, G. B. & ZANNIS-HADJOPOULOS, M. 1998. Concurrent replication and methylation at mammalian origins of replication. *Mol Cell Biol*, 18, 3475-82.
- ATKINSON, D. E. & WALTON, G. M. 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J Biol Chem*, 242, 3239-41.
- ATTWOOD, J. T., YUNG, R. L. & RICHARDSON, B. C. 2002. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci*, 59, 241-57.
- BARTEL, R. L. & BORCHARDT, R. T. 1984. Effects of Adenosine Dialdehyde on S-Adenosylhomocysteine Hydrolase and S-Adenosylmethionine-Dependent Transmethylations in Mouse L929 Cells. *Molecular Pharmacology*, 25, 418-424.
- BIRD, A. 1992. The essentials of DNA methylation. *Cell*, 70, 5-8.
- BONTEMPS, F. & VAN DEN BERGHE, G. 1997. Metabolism of exogenous S-adenosylmethionine in isolated rat hepatocyte suspensions: methylation of

plasma-membrane phospholipids without intracellular uptake. *Biochem J*, 327 (Pt 2), 383-9.

- BORCHARDT, R. T., EIDEN, L. E., WU, B. & RUTLEDGE, C. O. 1979. Sinefungin, a potent inhibitor of S-adenosylmethionine: protein O-methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*, 89, 919-24.
- BROWN, T. 1996. *Gentechnologie für Einsteiger*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- CANTONI, G. 1952. The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *J Amer Chem Soc*, 2942-2943.
- CANTONI, G. & CHIANG, P. 1980. The Role of S-Adenosylhomocysteine and S-Adenosylhomocysteine Hydrolase in the Control of Biological Methylations. In: CAVALLINI, D., GAULL, G. & ZAPPIA, V. (eds.) *Natural Sulfur Compounds*. Springer US.
- CANTONI, G., RICHARDS, H. & CHIANG, P. 1979. Inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase and their role in the regulation of biological methylation. In: E USIDIN, B. R., AND CR CREVELING (ed.) *Transmethylation*. New York: Elsevier/North-Holland.
- CANTONI, G. L. 1975. Biological methylation: selected aspects. *Annu Rev Biochem*, 44, 435-51.
- CANTONI, G. L. & SCARANO, E. 1954. THE FORMATION OF S-ADENOSYLHOMOCYSTEINE IN ENZYMATIC TRANSMETHYLATION REACTIONS1. *Journal of the American Chemical Society*, 76, 4744-4744.
- CAUDILL, M. A., WANG, J. C., MELNYK, S., POGRIBNY, I. P., JERNIGAN, S., COLLINS, M. D., SANTOS-GUZMAN, J., SWENDSEID, M. E., COGGER, E. A. & JAMES, S. J. 2001. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr*, 131, 2811-8.
- CHEN, Y. M. & SUN, A. Y. 1998. Activation of transcription factor AP-1 by extracellular ATP in PC12 cells. *Neurochemical Research*, 23, 543-550.

- CLARKE, S. & BANFIELD, K. 2001. S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases. In: CARMEL, R. & JACOBSEN, D. (eds.) *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge University Press.
- COX, G. S., KABACK, H. R. & WEISSBACH, H. 1974. Defective transport in S-adenosylmethionine synthetase mutants of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, 161, 610-20.
- DE LA HABA, G. & CANTONI, G. L. 1959. The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J Biol Chem*, 234, 603-8.
- DELABAR, U., KLOOR, D., LUIPPOLD, G. & MUHLBAUER, B. 1999. Simultaneous determination of adenosine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in biological samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 724, 231-8.
- DEMPSEY, B., JACOBSSON, A., OLSSON, M., ROBINS, P. & LINDAHL, T. 1982. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Physical properties of O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *J Biol Chem*, 257, 13776-80.
- DETICH, N., THEBERGE, J. & SZYF, M. 2002. Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem*, 277, 35791-4.
- EDEN, A., GAUDET, F., WAGHMARE, A. & JAENISCH, R. 2003. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 300, 455.
- ELORANTA, T. O. & KAJANDER, E. O. 1984. Catabolism and lability of S-adenosyl-L-methionine in rat liver extracts. *Biochem J*, 224, 137-44.
- ELORANTA, T. O., KAJANDER, E. O. & RAINA, A. M. 1982. Effect of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine on the metabolism of S-adenosylhomocysteine, S-adenosylmethionine, and adenosine in rat liver. *Med Biol*, 60, 272-7.
- ESTELLER, M. 2006. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*, 27, 1121-5.
- ESTELLER, M., GARCIA-FONCILLAS, J., ANDION, E., GOODMAN, S. N., HIDALGO, O. F., VANACLOCHA, V., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 2000. Inactivation of the

DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, 343, 1350-4.

- ESTELLER, M., HAMILTON, S. R., BURGER, P. C., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 1999. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*, 59, 793-7.
- FERREIRA, R., EBERHARTER, A., BONALDI, T., CHIODA, M., IMHOF, A. & BECKER, P. B. 2007. Site-specific acetylation of ISWI by GCN5. *BMC Mol Biol*, 8, 73.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- GAUDET, F., HODGSON, J. G., EDEN, A., JACKSON-GRUSBY, L., DAUSMAN, J., GRAY, J. W., LEONHARDT, H. & JAENISCH, R. 2003. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 300, 489-92.
- GIBSON, K. D., WILSON, J. D. & UDENFRIEND, S. 1961. The Enzymatic Conversion of Phospholipid Ethanolamine to Phospholipid Choline in Rat Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 236, 673-679.
- GORLIA, T., WU, W., WANG, M., BAUMERT, B. G., MEHTA, M., BUCKNER, J. C., SHAW, E., BROWN, P., STUPP, R., GALANIS, E., LACOMBE, D. & VAN DEN BENT, M. J. 2013. New validated prognostic models and prognostic calculators in patients with low-grade gliomas diagnosed by central pathology review: a pooled analysis of EORTC/RTOG/NCCTG phase III clinical trials. *Neuro Oncol*, 15, 1568-79.
- GRASBON-FRODL, E. M., KRETH, F. W., RUITER, M., SCHNELL, O., BISE, K., FELSBERG, J., REIFENBERGER, G., TONN, J. C. & KRETZSCHMAR, H. A. 2007. Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer*, 121, 2458-64.
- GUPTA, R. C. & DETTBARN, W. D. 1987. Alterations of high-energy phosphate compounds in the skeletal muscles of rats intoxicated with

- diisopropylphosphorofluoridate (DFP) and Soman. *Fundam Appl Toxicol*, 8, 400-7.
- GUPTA, R. C., GOAD, J. T. & KADEL, W. L. 1994. Energy related metabolic alterations in diaphragm muscle resulting from acute methomyl toxicity. *Neurotoxicology*, 15, 321-30.
 - GUPTA, R. C., GOAD, J. T., MILATOVIC, D. & DETTBARN, W. D. 2000. Cholinergic and noncholinergic brain biomarkers of insecticide exposure and effects. *Hum Exp Toxicol*, 19, 297-308.
 - GUPTA, R. C., MILATOVIC, D. & DETTBARN, W. D. 2001a. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. *Neurotoxicology*, 22, 271-82.
 - GUPTA, R. C., MILATOVIC, D. & DETTBARN, W. D. 2001b. Nitric oxide modulates high-energy phosphates in brain regions of rats intoxicated with diisopropylphosphorofluoridate or carbofuran: prevention by N-tert-butyl-alpha-phenylnitrone or vitamin E. *Arch Toxicol*, 75, 346-56.
 - GUPTA, R. C., MILATOVIC, D. & DETTBARN, W. D. 2002. Involvement of nitric oxide in myotoxicity produced by diisopropylphosphorofluoridate (DFP)-induced muscle hyperactivity. *Arch Toxicol*, 76, 715-26.
 - HAFERKAMP, I., PENZ, T., GEIER, M., AST, M., MUSHAK, T., HORN, M. & SCHMITZ-ESSER, S. 2013. The endosymbiont *Amoebophilus asiaticus* encodes an S-adenosylmethionine carrier that compensates for its missing methylation cycle. *J Bacteriol*, 195, 3183-92.
 - HARTMANN, C., HENTSCHEL, B., WICK, W., CAPPER, D., FELSBURG, J., SIMON, M., WESTPHAL, M., SCHACKERT, G., MEYERMANN, R., PIETSCH, T., REIFENBERGER, G., WELLER, M., LOEFFLER, M. & VON DEIMLING, A. 2010. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathologica*, 120, 707-718.

- HEGI, M. E., DISERENS, A. C., GORLIA, T., HAMOU, M. F., DE TRIBOLET, N., WELLER, M., KROS, J. M., HAINFELLNER, J. A., MASON, W., MARIANI, L., BROMBERG, J. E., HAU, P., MIRIMANOFF, R. O., CAIRNCROSS, J. G., JANZER, R. C. & STUPP, R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 997-1003.
- HEGI, M. E., LIU, L., HERMAN, J. G., STUPP, R., WICK, W., WELLER, M., MEHTA, M. P. & GILBERT, M. R. 2008. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*, 26, 4189-99.
- HELLAND, S. & UELAND, P. M. 1983. Effect of 2'-deoxycoformycin infusion on S-adenosylhomocysteine hydrolase and the amount of S-adenosylhomocysteine and related compounds in tissues of mice. *Cancer Res*, 43, 4142-7.
- HERMAN, J. G., GRAFF, J. R., MYOHANEN, S., NELKIN, B. D. & BAYLIN, S. B. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9821-6.
- HERMES, M. 2004a. Die Rolle der S-Adenosyl-L-homocystein-Hydrolase bei der Regulation der DNA- und RNA-Methylierung sowie der Genexpression und Apoptose. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- HERMES, M. 2004b. Die Rolle der S-Adenosyl-L-homocystein-Hydrolase bei der Regulation der DNA- und RNA-Methylierung sowie der Genexpression und Apoptose.
- HERMES, M., OSSWALD, H., MATTAR, J. & KLOOR, D. 2004. Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. *Exp Cell Res*, 294, 325-34.
- HERMES, M., VON HIPPEL, S., OSSWALD, H. & KLOOR, D. 2005. S-adenosylhomocysteine metabolism in different cell lines: effect of hypoxia and cell density. *Cell Physiol Biochem*, 15, 233-44.
- HOFFMAN, D. R., CORNATZER, W. E. & DUERRE, J. A. 1979. RELATIONSHIP BETWEEN TISSUE LEVELS OF S ADENOSYL METHIONINE S ADENOSYL HOMO

CYSTEINE AND TRANS METHYLATION REACTIONS. *Canadian Journal of Biochemistry*, 57, 56-64.

- HOFFMAN, D. R., HANING, J. A. & CORNATZER, W. E. 1981. Microsomal phosphatidylethanolamine methyltransferase: inhibition by S-adenosylhomocysteine. *Lipids*, 16, 561-7.
- HOFFMAN, J. L. 1986. Chromatographic analysis of the chiral and covalent instability of S-adenosyl-L-methionine. *Biochemistry*, 25, 4444-9.
- HOFFMANN, J. 1979. Inhibition of S-adenosyl sulfur amino acid metabolism: periodate oxidized nucleosides as potent inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. In: E USDIN, B. R., AND CR CREVELING (ed.) *Transmethylation*. New York: Elsevier/North-Holland.
- HOWARD, G., EIGES, R., GAUDET, F., JAENISCH, R. & EDEN, A. 2008. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene*, 27, 404-8.
- HU, Y., KOMOTO, J., HUANG, Y., GOMI, T., OGAWA, H., TAKATA, Y., FUJIOKA, M. & TAKUSAGAWA, F. 1999. Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. *Biochemistry*, 38, 8323-33.
- JOHNSON, D. R. & O'NEILL, B. P. 2012. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol*, 107, 359-64.
- KALLIO, P. J., PONGRATZ, I., GRADIN, K., MCGUIRE, J. & POELLINGER, L. 1997. Activation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: Posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5667-5672.
- KANAI, Y., SAITO, Y., USHIJIMA, S. & HIROHASHI, S. 2004. Alterations in gene expression associated with the overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, during human hepatocarcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130, 636-44.

- KERINS, D. M., KOURY, M. J., CAPDEVILA, A., RANA, S. & WAGNER, C. 2001. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr*, 74, 723-9.
- KLOOR, D., HERMES, M., FINK, K., SCHMID, H., KLINGEL, K., MACK, A., GRENZ, A. & OSSWALD, H. 2007. Expression and localization of S-adenosylhomocysteine-hydrolase in the rat kidney following carbon monoxide induced hypoxia. *Cell Physiol Biochem*, 19, 57-66.
- KLOOR, D., KURZ, J., FUCHS, S., FAUST, B. & OSSWALD, H. 1996. S-adenosylhomocysteine-hydrolase from bovine kidney: enzymatic and binding properties. *Kidney Blood Press Res*, 19, 100-8.
- KLOOR, D., LUDTKE, A., STOEVA, S. & OSSWALD, H. 2003. Adenosine binding sites at S-adenosylhomocysteine hydrolase are controlled by the NAD⁺/NADH ratio of the enzyme. *Biochem Pharmacol*, 66, 2117-23.
- KRAMER, D. L., PORTER, C. W., BORCHARDT, R. T. & SUFRIN, J. R. 1990. Combined modulation of S-adenosylmethionine biosynthesis and S-adenosylhomocysteine metabolism enhances inhibition of nucleic acid methylation and L1210 cell growth. *Cancer Res*, 50, 3838-42.
- KURASH, J. K., LEI, H., SHEN, Q., MARSTON, W. L., GRANDA, B. W., FAN, H., WALL, D., LI, E. & GAUDET, F. 2008. Methylation of p53 by Set7/9 mediates p53 acetylation and activity in vivo. *Mol Cell*, 29, 392-400.
- LALEZARI, S., CHOU, A. P., TRAN, A., SOLIS, O. E., KHANLOU, N., CHEN, W., LI, S., CARRILLO, J. A., CHOWDHURY, R., SELFRIDGE, J., SANCHEZ, D. E., WILSON, R. W., ZURAYK, M., LALEZARI, J., LOU, J. J., ORMISTON, L., ANCHETA, K., HANNA, R., MILLER, P., PICCIONI, D., ELLINGSON, B. M., BUCHANAN, C., MISCHEL, P. S., NGHIEMPHU, P. L., GREEN, R., WANG, H. J., POPE, W. B., LIAU, L. M., ELASHOFF, R. M., CLOUGHESY, T. F., YONG, W. H. & LAI, A. 2013. Combined analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression and promoter methylation provides optimized prognostication of glioblastoma outcome. *Neuro Oncol*, 15, 370-81.

- LEISTENSCHNEIDER, P. 2004. Bedeutung von Mutationen, DNA-Proteininteraktionen und DNA-Methylierung bei der Karzinogenese.: Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- LESCAULT, A. & LABERGE, C. 1974. [Effects of methionine poisoning on energy metabolism in the guinea pig liver]. *Union Med Can*, 103, 456-9.
- LITEPLO, R. G. 1988. DNA (cytosine) methylation in murine and human tumor cell lines treated with S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors. *Cancer Lett*, 39, 319-27.
- MATTAR, J. 2006. Einfluss von Adenosin-2'33-Dialdehyd auf deas Methylierungspotential und die Genexpression in HepG2-Zellen unter normoxischen Bedingungen. Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Tübingen.
- MCMILLAN, J. M., WALLE, U. K. & WALLE, T. 2005. S-adenosyl-L-methionine: transcellular transport and uptake by Caco-2 cells and hepatocytes. *J Pharm Pharmacol*, 57, 599-605.
- MILLER, C. A. & SWEATT, J. D. 2007. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53, 857-69.
- MOLLEMANN, M., WOLTER, M., FELSBERG, J., COLLINS, V. P. & REIFENBERGER, G. 2005. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer*, 113, 379-85.
- OSSWALD, H., BREIDBACH, K.-H., KLOOR, D. AND ENGLERT, R. 1999. *Filtrationsapparatur zur Trennung von Reaktionsgemischen*. DE patent application.
- OSSWALD, H., SCHMITZ, H. J. & KEMPER, R. 1977. Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation. *Pflugers Arch*, 371, 45-9.
- PASCALE, R. M., SIMILE, M. M., DE MIGLIO, M. R. & FEO, F. 2002. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine. *Alcohol*, 27, 193-8.

- PERNA, A. F., INGROSSO, D., SATTA, E., ROMANO, M., CIMMINO, A., GALLETTI, P., ZAPPIA, V. & DE SANTO, N. G. 2001. Metabolic consequences of hyperhomocysteinemia in uremia. *Am J Kidney Dis*, 38, S85-90.
- POGRIBNY, I., YI, P. & JAMES, S. J. 1999. A sensitive new method for rapid detection of abnormal methylation patterns in global DNA and within CpG islands. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 624-8.
- PREUSSER, M., CHARLES JANZER, R., FELSBERG, J., REIFENBERGER, G., HAMOU, M. F., DISERENS, A. C., STUPP, R., GORLIA, T., MAROSI, C., HEINZL, H., HAINFELLNER, J. A. & HEGI, M. 2008. Anti-O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry in glioblastoma multiforme: observer variability and lack of association with patient survival impede its use as clinical biomarker. *Brain Pathol*, 18, 520-32.
- RADOMSKI, N., KAUFMANN, C. & DREYER, C. 1999. Nuclear accumulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase in transcriptionally active cells during development of *Xenopus laevis*. *Mol Biol Cell*, 10, 4283-98.
- RAVANEL, S., BLOCK, M. A., RIPPERT, P., JABRIN, S., CURIEN, G., REBEILLE, F. & DOUCE, R. 2004. Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem*, 279, 22548-57.
- RIZWANA, R. & HAHN, P. J. 1999. CpG methylation reduces genomic instability. *Journal of cell science*, 112 (Pt 24), 4513-9.
- ROBERTSON, K. D. & JONES, P. A. 2000. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21, 461-467.
- ROCCO, N., RISPOLI, C., PAGANO, G., ASCIONE, S., COMPAGNA, R., DANZI, M., ACCURSO, A. & AMATO, B. 2013. Undertreatment of breast cancer in the elderly. *BMC Surg*, 13 Suppl 2, S26.
- SAHEBJAM, S., MCNAMARA, M. & MASON, W. P. 2012. Management of glioblastoma in the elderly. *Clin Adv Hematol Oncol*, 10, 379-86.
- SAITO, Y., KANAI, Y., SAKAMOTO, M., SAITO, H., ISHII, H. & HIROHASHI, S. 2002. Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4,

- associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10060-5.
- SCHINKE, C., MO, Y., YU, Y., AMIRI, K., SOSMAN, J., GREALLY, J. & VERMA, A. 2010. Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 20, 253-65.
 - SCHLENK, F. & ZYDEK-CWICK, C. R. 1969. The stability of the glycosidic bond of S-adenosylsulfonium compounds toward acid. ANL-7635. *ANL Rep*, 201-3.
 - SCHWEDT, G. 1994. *Chromatographische Trennmethoden: Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen*.
 - SELLEVOLD, O. F., JYNGE, P. & AARSTAD, K. 1986. High performance liquid chromatography: a rapid isocratic method for determination of creatine compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue. *J Mol Cell Cardiol*, 18, 517-27.
 - SHIMA, K., MORIKAWA, T., BABA, Y., NOSHO, K., SUZUKI, M., YAMAUCHI, M., HAYASHI, M., GIOVANNUCCI, E., FUCHS, C. S. & OGINO, S. 2011. MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. *Cancer Causes Control*, 22, 301-9.
 - SIEGFRIED, Z., EDEN, S., MENDELSON, M., FENG, X., TSUBERI, B. Z. & CEDAR, H. 1999. DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet*, 22, 203-6.
 - SINGAL, R. & GINDER, G. D. 1999. DNA methylation. *Blood*, 93, 4059-70.
 - STUPP, R., MASON, W. P., VAN DEN BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDAHN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., EISENHAEUER, E., MIRIMANOFF, R. O., EUROPEAN ORGANISATION FOR, R., TREATMENT OF CANCER BRAIN, T., RADIOTHERAPY, G. & NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS, G. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 987-96.
 - SUZUKI, M. M. & BIRD, A. 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 9, 465-76.

- TAKAI, D. & JONES, P. A. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3740-5.
- URNOV, F. D. 2002. Methylation and the genome: the power of a small amendment. *J Nutr*, 132, 2450S-2456S.
- USHIJIMA, T. 2005. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 5, 223-31.
- VAN PHI, L. & SOLING, H. D. 1982. Methyl group transfer from exogenous S-adenosylmethionine on to plasma-membrane phospholipids without cellular uptake in isolated hepatocytes. *Biochem J*, 206, 481-7.
- WEILER, M., HARTMANN, C., WIEWRODT, D., HERRLINGER, U., GORLIA, T., BAHR, O., MEYERMANN, R., BAMBERG, M., TATAGIBA, M., VON DEIMLING, A., WELLER, M. & WICK, W. 2010. Chemoradiotherapy of newly diagnosed glioblastoma with intensified temozolomide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 77, 670-6.
- WELLER, M. 2013. Assessing the MGMT status in glioblastoma: one step forward, two steps back? *Neuro Oncol*, 15, 253-4.
- WELLER, M., STUPP, R., REIFENBERGER, G., BRANDES, A. A., VAN DEN BENT, M. J., WICK, W. & HEGI, M. E. 2010. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*, 6, 39-51.
- WICK, W., HARTMANN, C., ENGEL, C., STOFFELS, M., FELSBERG, J., STOCKHAMMER, F., SABEL, M. C., KOEPPEN, S., KETTER, R., MEYERMANN, R., RAPP, M., MEISNER, C., KORTMANN, R. D., PIETSCH, T., WIESTLER, O. D., ERNEMANN, U., BAMBERG, M., REIFENBERGER, G., VON DEIMLING, A. & WELLER, M. 2009. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol*, 27, 5874-80.
- WICK, W., MEISNER, C., HENTSCHEL, B., PLATTEN, M., SABEL, M., KOEPPEN, S., KETTER, R., SIMON, M., REIFENBERGER, G. & WELLER, M. 2012a. Prognostic or Predictive Value of Mgmt Promoter Methylation in Malignant Gliomas Depends on Idh1 Mutations. *Neuro-Oncology*, 14, 7-7.

- WICK, W., PLATTEN, M., MEISNER, C., FELSBERG, J., TABATABAI, G., SIMON, M., NIKKHAH, G., PAPSDORF, K., STEINBACH, J. P., SABEL, M., COMBS, S. E., VESPER, J., BRAUN, C., MEIXENSBERGER, J., KETTER, R., MAYER-STEINACKER, R., REIFENBERGER, G., WELLER, M. & SOCIETY, N. O. A. S. G. O. N.-O. W. G. O. G. C. 2012b. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 13, 707-15.
- YANG, M. S. & GUPTA, R. C. 2003. Determination of Energy Charge Potential in the C6 Glioma and the HepG-2 Cell Culture. *Toxicol Mech Methods*, 13, 97-101.
- YI, P., MELNYK, S., POGRIBNA, M., POGRIBNY, I. P., HINE, R. J. & JAMES, S. J. 2000. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem*, 275, 29318-23.
- YIN, A. A., ZHANG, L. H., CHENG, J. X., DONG, Y., LIU, B. L., HAN, N. & ZHANG, X. 2013. Radiotherapy plus concurrent or sequential temozolomide for glioblastoma in the elderly: a meta-analysis. *PLoS One*, 8, e74242.
- YODER, J. A., WALSH, C. P. & BESTOR, T. H. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13, 335-40.

Danksagung

Ich möchte mich hier ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Doris Kloor bedanken. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht zu einem Ende gekommen, vielen Dank für die Zeit und Hilfe, die Inspiration und die Geduld.

Außerdem gilt mein besonderer Dank meiner zweiten Betreuerin und praktischen Anleiterin, Marina Hermes, die mir unermüdlich und mit viel Geduld stets zur Seite stand, Anteil nahm, wenn etwas nicht klappte und immer wieder weiterhalf wenn ich nicht weiter wusste.

Und natürlich darf hier Renate Riehle nicht unerwähnt bleiben, unsere gute Seele. Auch Dir vielen Dank für deine Aufmunterungen, Deine tatkräftige praktische Unterstützung und Deine herzliche Art.

Meiner Frau und meinen Kindern danke ich, dass sie mich auch in übelster Laune immer irgendwie ertragen haben...und meinem Freund Sebastian für das Korrekturlesen und das Sushi.